

Universidade de Brasília – UnB



Instituto de Ciências Biológicas

Pós-graduação em Biologia Molecular

**ENGENHARIA GENÉTICA DE LEVEDURAS PARA
PRODUÇÃO DE QUÍMICOS DE ALTO VALOR
AGREGADO**

Agosto de 2019

Universidade de Brasília – UnB



Instituto de Ciências Biológicas

Pós-graduação em Biologia Molecular

**ENGENHARIA GENÉTICA DE LEVEDURAS PARA
PRODUÇÃO DE QUÍMICOS DE ALTO VALOR
AGREGADO**

Autor: Lucas Silva Carvalho

Orientador: Nádia Skorupa Parachin

Agosto de 2019

Título: ENGENHARIA GENÉTICA DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE QUÍMICOS DE ALTO VALOR AGREGADO

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de **Doutor** em Biologia Molecular do programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Agosto de 2019

Banca Examinadora:

Dr^a Talita Souza Carmo (UnB)

Dr^a Eliane Ferreira Noronha (UnB)

Dr^a. Juliana Davies de Oliveira (UCB)

Dr^a. Cynthia Maria Kyaw (Suplente) (UnB)

Dedicatória

À minha esposa, família, mestres e amigos.

Resumo

A construção de novas cepas geneticamente modificadas capazes de produzir produtos químicos de alto valor agregado permite a implementação de novas tecnologias amigáveis ao meio ambiente que podem reduzir a demanda de combustíveis fósseis. Biomoléculas e polímeros aumentaram sua participação no mercado devido ao desenvolvimento de microrganismos feitos sob medida que permitem uma tecnologia competitiva em termos de custo, como exemplo, o ácido hialurônico e o ácido láctico aumentaram sua demanda nos últimos anos devido a suas aplicações nas indústrias biomédica, automobilística e plástica. Neste estudo, duas linhagens de leveduras foram geneticamente modificadas para a produção de ácido hialurônico e ácido láctico. Entre as várias vantagens de usar leveduras como plataforma para a produção de produtos químicos, pode-se enfatizar sua capacidade de superar as oscilações de pressão, temperatura e pH durante o crescimento e produção. Além disso, esses microrganismos apresentam fontes de energia, como o glicerol, subproduto da indústria do biodiesel. As principais estratégias de modificação genética para o desenvolvimento de cepas de *Hansenula (Ogataea) polymorpha* e *Kluyveromyces lactis* para produção de ácido hialurônico são descritas neste estudo. Finalmente, uma linhagem de *Pichia (Komagataella) pastoris* que superexpressa um transportador de lactato chamado PAS também foi desenvolvida, para melhorar a produção de ácido láctico.

Abstract

The construction of novel genetically modified strain able to produce high added value chemicals enables the implementation of novel environmental-friendly technologies that will reduce fossil-fuel demand. Therefore bio-molecules and -polymers increased its market share due to the development of tailor-made microorganisms that enable a cost-competitive technology. As an example, hyaluronic acid and lactic acid increased its demand over the last years due to its applications in the biomedical, automobilists, and plastic industries. Here in this study, two yeast strains were genetically modified for production of Hyaluronic acid and lactic acid. Among several advantages of using yeast as a platform for chemical production, it can be emphasized its ability to overcome oscillation in pressure, temperature, and pH during the scale-up process. Besides, these microorganisms present energy sources, such as glycerol, a byproduct of the biodiesel industry. The main genetic modification strategies for developing *Hansenula (Ogateae) polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* strains for hyaluronic acid production are described in this study. Finally, a *Pichia (Komagataella pastoris)* strain that overexpresses a putative lactate transporter called PAS was also developed for the improvement of lactic acid production.

Sumário

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 ÁCIDO HIALURÔNICO	5
1.2 MERCADO E NOVAS ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	8
1.3 <i>OGATAEA (HANSENULA) POLYMORPHA</i>	10
1.4 <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i>	11
2. OBJETIVO GERAL.....	12
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	13
4.2 PCR.....	14
4.3 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM CÉLULAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E POSTERIOR PURIFICAÇÃO	14
4.4 TRATAMENTO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO	15
4.5 PURIFICAÇÃO DE DNA.....	15
4.6 LIGAÇÃO COM T4 DNA LIGASE	16
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DE CÉLULAS DE <i>ESCHERICHIA. COLI (THERMO FISHER SCIENTIFIC®)</i>	16
4.8 CONSTRUÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO	16
4.9 SÍNTESE DOS PLASMÍDEOS CONTENDO O GENE HASA (PBSK-HASA1, PBSK-HASA2, PBSK-HASA3 E PBSK-HASAP) E DO GENE HASB (PBSK-HASB)	17
4.10 EXTRAÇÃO DOS GENES HASA E INSERÇÃO NO PLASMÍDEO PHIPZ18 DE MODO A FORMAR AS CONSTRUÇÕES PHIPZ18+HASA1, PHIPZ18+HASA2, PHIPZ18+HASA3 E PHIPZ18+HASAP.	19
4.11 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DO GENE HASB.	19
4.12 PURIFICAÇÃO DO GENE HASC POR PCR E MONTAGEM UTILIZANDO O PLASMÍDEO P424 CONTENDO O PROMOTOR TEF. 20	
4.13 INTRODUÇÃO DE HASB AOS PLASMÍDEOS PHIPZ18+HASA	21
4.14 INTRODUÇÃO DE HASC AOS PLASMÍDEOS PHIPZ18+HASA+HASB,	23
4.15 INSERÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS GENES CONDIFICADORES PARA A VIA DE SÍNTESE DE AH EM <i>O.</i> <i>POLYMORPHA</i>	24
4.16 CONFIRMAÇÃO DE INTEGRAÇÃO DOS GENES (PCR DE COLÔNIA) E SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS.....	25
4.17 CONSTRUÇÃO DE HASB EM PKLAC2 (NEB).....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 MONTAGEM DOS CASSETES DE EXPRESSÃO E DO PLASMÍDEO PARA INTEGRAÇÃO EM <i>O. POLYMORPHA</i>	28
5.1.1 <i>pHIPZ18+hasA</i>	28
5.1.2 <i>Introdução de hasB e hasC aos plasmídeos pHIPZ18+hasA2 e pHIPZ18+ hasAP</i>	30

5.2	TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS FINAIS EM <i>O. POLYMORPHA</i>	31
5.3	CONSTRUÇÃO DE pKLAC2 COM HASB.....	33
CAPÍTULO 2		35
1. INTRODUÇÃO.....		37
1.1.	<i>PICHIA (KOMAGATAELLA) PASTORIS</i>	37
1.2.	ÁCIDO LÁTICO.....	37
1.3.	POLI-ÁCIDO-LÁTICO	38
1.4.	ENGENHARIA METABÓLICA DE MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE L-ÁCIDO LÁTICO.....	39
2. OBJETIVO GERAL		41
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....		41
4. MATERIAL E MÉTODOS		42
4.1.	PREPARAÇÃO DE CEPAS PARA EXPRESSÃO DE GENES TRANSPORTADORES DE LACTATO.....	42
4.2.	EXTRAÇÃO DE DNA	42
4.3.	AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE PAS	43
4.4.	LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA (VETOR-INSERTO).....	43
4.5.	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES PARA ELETROPORAÇÃO (MGCL2) (ADAPTADO DE SAMBROOK ET AL., 1989).	43
4.6.	TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS COM pPICK-PGK+PAS	44
4.7.	PREPARO DE DNA EM LARGA ESCALA	44
4.8.	PROTOCOLO PARA ENSAIO DE TRANSPORTADOR UTILIZANDO LACTATO MARCADO COM C14 (ADAPTADO DE PAIVA; KRUCKEBERG; CASAL, 2002)	45
4.9.	TRANSFORMAÇÃO EM <i>K. PASTORIS</i> (SCORER ET AL., 1994),	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO		49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		51
7. ANEXOS		58
7.1	ANEXO 1 – RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE (BR10201602019).....	58
7.2	ANEXO 2 – RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE (BR10201602018).....	59
7.3	ANEXO 3.....	60
7.4	ANEXO 4 - RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE (BR10201500745)	79
7.5	ANEXO 5	80

Índice de Figuras

FIGURA 1 PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS DURANTE A CONSTRUÇÃO DE LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL. A PARTIR DE INFORMAÇÕES GENÔMICAS DO ORGANISMO ALVO PODE-SE DESENVOLVER ESTRATÉGIAS DE ALTERAÇÕES DE INFORMAÇÕES GÊNICAS, SÍNTESE DE GENES POR EXEMPLO, CLONAGEM DAS INFORMAÇÕES EM VETORES EM UMA PRIMEIRA ETAPA (CASSETES 1 E 2) COM AUXÍLIO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (ER), TRANSFORMAÇÃO EM BACTÉRIAS PARA AMPLIFICAÇÃO DESTAS INFORMAÇÕES. PREPARAÇÃO DO VETOR PARA LINEARIZAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO EM LEVEDURAS. ALTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO METABÓLICO DA LEVEDURA LEVANDO A PRODUÇÃO DOS PRODUTOS DE INTERESSE. RB E RY SE REFEREM AOS GENES REPÓRTER PARA BACTÉRIA E PARA LEVEDURA, RESPECTIVAMENTE.....	4
FIGURA 2 ESTRUTURA DAS UNIDADES CONSTITUINTES DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	5
FIGURA 3 VIA METABÓLICA PARA SÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO MOSTRANDO TODOS OS SUBSTRATOS NECESSÁRIOS PARA SÍNTESE DO POLÍMERO.....	7
FIGURA 4 AS DUAS CLASSES CONHECIDAS ATUALMENTE DE SINTASES DE ÁCIDO HIALURÔNICO, CLASSE I (A) E CLASSE II(B) QUE APESAR DE TEREM VÁRIAS DIFERENÇAS ESTRUTURAIS, POSSUEM EM COMUM DOMÍNIOS TRANSMEMBRÂNICOS, INDICANDO QUE ESTAS ENZIMAS ESTÃO ASSOCIADAS À MEMBRANA DAS CÉLULAS E CATALISAM A JUNÇÃO DOS DOIS PRECURSORES NO LADO CITOPLASMÁTICOS DA CÉLULA, AO PASSO QUE JÁ EXPULSAM PARA FORA A CADEIA CRESCENTE DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	8
FIGURA 5 PLASMÍDEOS CONTENDO OS GENES SINTÉTICOS APÓS OTIMIZAÇÃO DE CÓDONS PARA LEVEDURAS. NOS PLASMÍDEOS APRESENTADOS INCLUEM UMA ORIGEM DE REPLICAÇÃO PARA PROPAGAÇÃO EM CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI (PUC ORIGIN); UM GENE DE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO AMPICILINA PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI CLONADAS (AMPICILLIN). EM (A) É APRESENTADO O PLASMÍDEO SINTÉTICO PBSK-HASA1 (4612 PB). EM (B) É MOSTRADO O PLASMÍDEO SINTÉTICO PBSK-HASA2 (4540 PB). EM (C) É MOSTRADO O PLASMÍDEO SINTÉTICO PBSK-HASA3 (4540 PB). EM (D) É APRESENTADO O PLASMÍDEO SINTÉTICO PBSK-HASAP (5815 PB).....	18
FIGURA 6 PLASMÍDEO CONTENDO A CONSTRUÇÃO DE HASB SOB CONTROLE DO PROMOTOR GPD.....	20
FIGURA 7 PLASMÍDEO CONTENDO A CONSTRUÇÃO DE HASC SOB CONTROLE DO PROMOTOR TEF.	21
FIGURA 8 PLASMÍDEO CONTENDO A CONSTRUÇÃO PHIPZ18+HASA+HASB.	23
FIGURA 9 CONSTRUÇÕES ESPERADAS DAS ISOFORMAS DE HASA EM PHIPZ18.	28
FIGURA 10 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE HASA2 EM PHIPZ18 POR PCR. 1 CORRESPONDE AO MARCADOR MOLECULAR 1KBPLUS, EM 2 É APRESENTADO O CONTROLE NEGATIVO DA REAÇÃO, DE 3 À 8 SÃO OBSERVADAS AS AMOSTRAS EM AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA AMOSTRA COM PLASMÍDEO PHIPZ18+HASA2. A BANDA INESPECÍFICA ABAIXO CORRESPONDE A UM GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA AJUSTE DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	29
FIGURA 11 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE HASAP EM PHIPZ18 POR PCR. 1 CORRESPONDE AO MARCADOR MOLECULAR 1KBPLUS, EM 2 À 10 SÃO OBSERVADAS AS AMOSTRAS EM AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA AMOSTRA COM PLASMÍDEO PHIPZ18+HASAP.....	29

FIGURA 12 A CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE HASB EM 2A CONTROLE POSITIVO, 3A P _{HIPZ18} + HASA2 E 4A P _{HIPZ18} + HASAP EM MONTAGEM COM O CASSETE COM PROMOTOR GPD, CONFIRMAÇÃO POR PCR. EM B CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO CASSETE CONTENDO HASC (POÇO 4B). 1A E 1B CORRESPONDEM AO MARCADOR 1KB PLUS. 2B É O CONTROLE NEGATIVO E 3B CORRESPONDE AO PLASMÍDEO ÍNACTO.....	30
FIGURA 13 EM A CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE HASA2 E HASAP NA LEVEDURA O. POLYMORPHA. EM B UM DOS MUITOS GÊIS COM CLONES QUE APRESENTARAM AMPLIFICAÇÃO ABERRANTE, NÃO CONFIRMANDO A PRESENÇA DE HASB.	32
FIGURA 14 IMAGEM DO GEL DE AGAROS DA PCR DE COLÔNIA, CONFIRMANDO DA PRESENÇA DE HASB.	32
FIGURA 15 ESQUEMA DO PLASMÍDEO CONTENDO A CONSTRUÇÃO p _{KLAC2} +HASB	33
FIGURA 16 REPRESENTAÇÃO DA VIA METABÓLICA NATURAL PARA A PRODUÇÃO DE LACTATO.....	38
FIGURA 17 – ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE LEVEDURAS COM MAIOR CAPACIDADE DE TRANSPORTE DE ÁCIDO LÁTICO PARA O MEIO EXTRACELULAR. A DETECÇÃO DO NÍVEL DE TRANSPORTE PODE SER FEITA POR CINTILOGRAFIA O QUE PERMITE A DETECÇÃO DE LACTATO MARCADO COM CARBONO RADIOATIVO (C14). L-LDH CORRESPONDE A INSERÇÃO DO GENE DE LACTATO DESIDROGENASSE NA CEPA QUE SUPEREXPRESSA UM GENE CONDIFICADOR PARA UM TRANSPORTADOR DE ÁCIDO LÁTICO.....	40
FIGURA 18 – ESQUEMA DO ENSAIO COM LACTATO MARCADO COM CARBONO RADIOATIVO C14.	47
FIGURA 19 -CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO TRANSPORTADOR PAS O GEL CORRESPONDE A UMA ELUIÇÃO DA BANDA PARA CONFIRMAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO.	49
FIGURA 20 - GRÁFICO DO ENSAIO DE TRANSPORTE COM O TRANSPORTADOR PAS DEMONSTRANDO UM AUMENTO DE TRANSPORTE DE L-ÁCIDO LÁTICO. O ENSAIO REALIZADO COM LACTATO MARCADO E DETECÇÃO POR CINTILOGRAFIA. A NORMALIZAÇÃO FOI FEITA D PELO CÁLCULO DE PESO SECO (DW)..	50

Índice de Tabelas

TABELA 1 – ORGANISMOS QUE PRODUZEM NATURALMENTE ÁCIDO HIALURÔNICO. RETIRADO E ADAPTADO DE OLIVEIRA ET AL., 2016.....	6
TABELA 2 – PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PROCARIOTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA PRODUZIR ÁCIDO HIALURÔNICO. RETIRADO E ADAPTADO DE OLIVEIRA ET AL., 2016.....	9
TABELA 3 – TABELA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.	13
TABELA 4 – PROPORÇÕES DE VOLUME DE PREPARO CELULAR E SOLUÇÃO 1 PARA ENSAIO DE LACTATO MARCADO COM CARBONO RADIOATIVO.....	46

Lista de abreviações e símbolos

AOX	Álcool oxidase
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
D-LA D(-)	ácido láctico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	Gramma
G	Força gravitacional
FDA	<i>Food and drug administration</i>
h	Hora
AH	Ácido Hialurônico
HAS	Ácido hialurônico sintase
kb	Quilobase
Km	Constante de Michaelis–Menten
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactato desidrogenase
L-LA L(+)	ácido láctico
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NaAc	Acetato de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
OD ₆₀₀	Densidade óptica medida a 600 nm
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGK	Fosfoglicerato quinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
pKa	Constante de dissociação ácida
PLA	Poli (ácido-lático)PP Polipropileno
p/v	Peso por volume
RNase	A Ribonuclease A
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
TAE	Tampão TRIS-acetato-EDTA
U	Unidade
V _{máx}	Velocidade máxima da reação
v	Volume
V	Volts
v/v	Volume por volume

YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Ω	ohm

Capítulo 1

Este capítulo tem como base as seguintes publicações obtidas durante o meu doutorado. As minhas contribuições para cada publicação estão descritas abaixo.

1. **CARVALHO, L. S.**; Parachin, N. S.; MAGALHAES, B. S. ; VIEIRA, A. M. ; DAVIES, J. . LEVEDURA RECOMBINANTE DA ESPÉCIE *Hansenula polymorpha* PARA A PRODUÇÃO DE GRANDES CADEIAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201602019, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 31/08/2016 (Anexo 1)

Contribuições: Esta patente foi redigida por mim. Desenvolvi o projeto inicial e realizei a análise de perfil metabólico de *Hansenula polymorpha* para o desenvolvimento da cepa.

2. Parachin, N. S.; MAGALHAES, B. S; VIEIRA, A. M.; DAVIES, J.; **CARVALHO, L. S.**. LEVEDURA RECOMBINANTE DA ESPÉCIE *KLUYVEROMYCES LACTIS* PARA A PRODUÇÃO DE GRANDES CADEIAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201602018, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 31/08/2016 (Anexo 2)

Contribuições: Realização dos experimentos para construção dos cassetes de expressão. Mais precisamente, contribuí com a montagem do hasB na construção do plasmídeo a ser inserido em *Kluyveromyces lactis*.

3. DE OLIVEIRA, JULIANA DAVIES; **CARVALHO, LUCAS SILVA**; GOMES, ANTÔNIO MILTON VIEIRA; QUEIROZ, LÚCIO REZENDE ; MAGALHÃES, BEATRIZ SIMAS ; PARACHIN, NÁDIA SKORUPA . Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*, v. 15, p. 119-126, 2016. (Anexo 3)

Contribuições: Contribuí com a redação deste trabalho, nos tópicos que incluem os organismos procarióticos capazes de produzir ácido hialurônico, seja por produção heteróloga seja por produção natural deste composto.

1. Introdução

Em 1991 o termo "engenharia metabólica" foi difundido após a consolidação das técnicas de DNA recombinante, utilizada para a construção e otimização de redes metabólicas, como objetivo aumentar a produtividade de uma determinada molécula por microrganismos (BAILEY, 1991). A inserção de rotas metabólicas heterólogas permite a extensão das vias existentes nos microrganismos para a obtenção de produtos como aminoácidos (BONGAERTS et al., 2001), antibacterianos (LEE et al., 2009), metabólitos, transcritos de RNA e biomoléculas de alto valor agregado e interesse industrial, além disso há possibilidade de modificar proteínas e redefinir vias metabólicas para degradar resíduos recalcitrantes (KEASLING, 2010).

A construção de novas cepas microbianas por meio de engenharia metabólica desempenha um papel importante no desenvolvimento de cepas capazes de aumentar a produção industrial (DOBSON; GRAY; RUMBOLD, 2012), substituir produtos de origem fóssil, além de utilizar rejeitos agro-industriais como substrato (KHOSLA; KEASLING, 2003). Diante disso, pode-se inferir que essa área de pesquisa permite o desenvolvimento de tecnologias como, por exemplo, leveduras capazes de produzir compostos de interesse industrial (Figura 1).

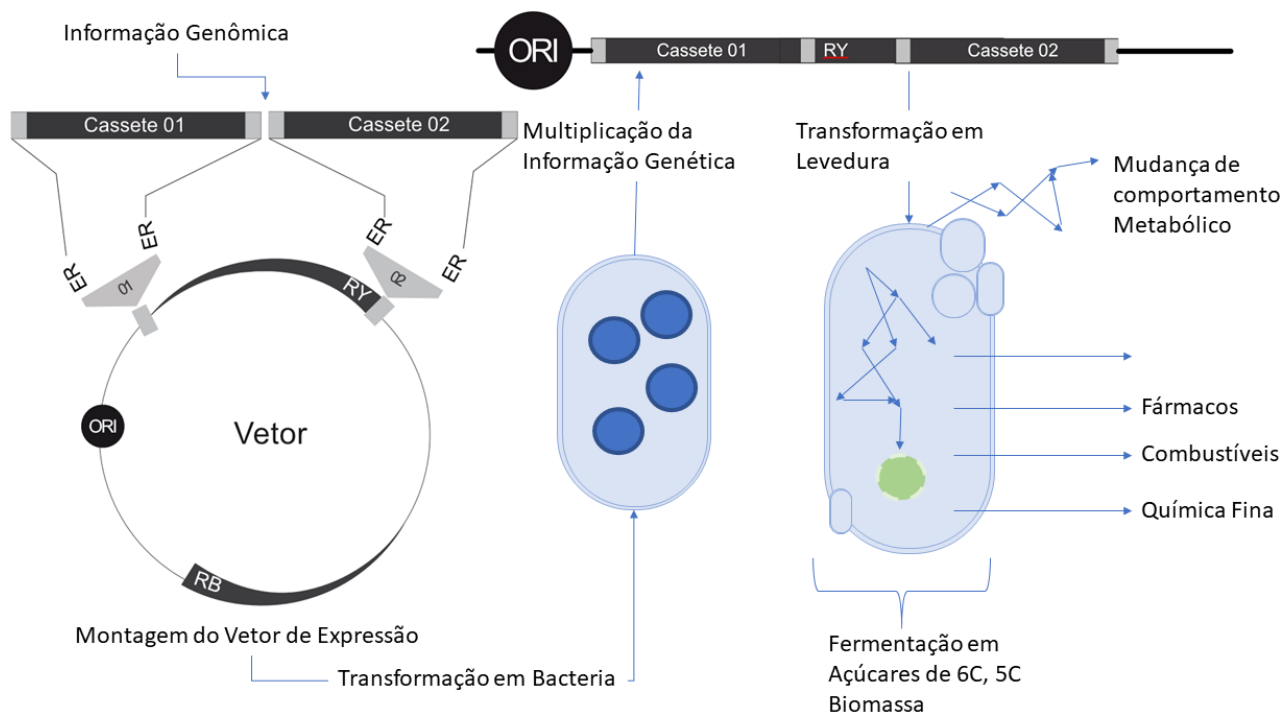


Figura 1 Principais etapas realizadas durante a construção de leveduras geneticamente modificadas para produção de compostos de interesse industrial. A partir de informações genômicas do organismo alvo pode-se desenvolver estratégias de alterações de informações gênicas, síntese de genes por exemplo, clonagem das informações em vetores em uma primeira etapa (cassetes 1 e 2) com auxílio de Enzimas de Restrição (ER), transformação em bactérias para amplificação destas informações. Preparação do vetor para linearização e Transformação em leveduras. Alteração do comportamento metabólico da levedura levando a produção dos produtos de interesse. RB e RY se referem aos genes repórter para bactéria e para levedura, respectivamente.

A aplicação da engenharia metabólica pode ser exemplificada pela engenharia genética de procariontos fotossintetizantes para a produção eficiente de bioetanol por meio do metabolismo fotoautotrófico. Genes de *Zymomonas mobilis* que codificam as enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) foram clonados em cassetes de expressão e inseridos em *Synechococcus elongatus*, levando à produção de etanol (DENG; COLEMAN, 1999) ou ainda isopropanol, tendo energia luminosa e dióxido de carbono como substrato desses organismos (KUSAKABE et al., 2013).

As leveduras possuem a vantagem de serem uma plataforma industrialmente robusta quando comparadas com bactérias, o que viabiliza o escalonamento para a produção de biocompostos. A *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo de levedura frequentemente modificada geneticamente, uma vez que sua fisiologia, metabolismo e genética têm sido intensamente estudados, o que viabiliza seu uso em diversas condições industriais (ALMQUIST et al., 2014; OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

As leveduras não convencionais, de uso incomum em escala industrial, tem suas ferramentas moleculares para modificação cada vez mais disponíveis, permitindo estabilidade e escalabilidade produtiva (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017; MANFRÃO-NETTO; GOMES; PARACHIN, 2019). Diante disso, a introdução de novas rotas metabólicas e a otimização de seus processos celulares nativos por meio da engenharia metabólica é crescente, tornando-as verdadeiras fábricas celulares de biomoléculas, em diversas aplicações.

1.1 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (Figura 2) (AH) é um heteropolímero linear formado por β -1-3 d-N-acetilglicosamina (GlcNAc) e β -1-4 D-ácido glucurônico (GlcUA) ligados alternadamente em repetições que podem levar a molécula de AH a atingir cerca de 1,5 MDa (WEIGEL; HASCALL; TAMMI, 1997). Inicialmente, o AH foi isolado do corpo

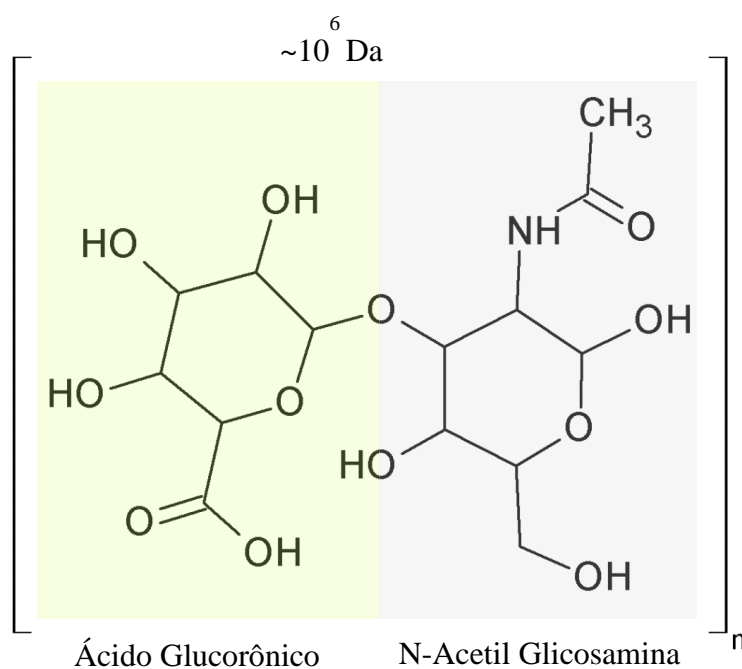


Figura 2 Estrutura das unidades constituintes do ácido hialurônico.

vítreo ocular, nomeando com o acrônimo de sua localização anatômica, membrana hialoide, presente na superfície externa do corpo vítreo e de suas moléculas constituintes (PALMER; JOHN, 1934).

O AH é um componente importante da matriz extracelular de vários tecidos animais (WEIGEL; HASCALL; TAMMI, 1997), produzido naturalmente por diversos microrganismos (Tabela 1). O AH é um polímero de peso molecular elevado sintetizado na membrana plasmática a partir da ação da ácido hialurônico sintase (*HAS A*), que tem como substratos o ácido glucorônico e N - acetilglucosamina sendo esses, por sua vez, sintetizados pelas enzimas *HAS B* e *D*, respectivamente (Tabela 1), e são os componentes chave para a síntese do polímero (LAURENT, TORVARD C.; FRASER, 1992). Estequiometricamente para cada mol do dissacarídeo de AH produzido são consumidos 2 mols de glicose, 3 mols de ATP, 2 mols de UTP e 1mol de acetil-Coenzima A (Figura 3).

Tabela 1 – Organismos que produzem naturalmente ácido hialurônico. Retirado e adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2016.

Microrganismos	Concentração de substrato (g / L)	Produtividade (g / L / h)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Glicose: 10	0,0396
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24	Glicose: 15	0,33
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Glicose: 10	0,223
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246)	Glicose: 20	NR ¹
<i>Streptococcus equi</i> ATCC 6580 (mutante)	Glicose: 80	0,344
<i>Streptococcus equi</i> ATCC 6580 (mutante)	Glicose: 80	0,47
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> G2 (mutante)	Glicose: 40	0,251
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> (superexpressão de genes envolvidos na biossíntese de UDP- N- acetilglucosamina)	Glicose: 20	NR
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102	Glicose: 40	0,289
Células de <i>Chlorella</i> infectadas com Chlorovirus	NR	NR
Clorovírus infectado com PBCV-1	NR	$1,6 \times 10^{-6}$
Clorovirus com PBCV-1 CV01	NR	$0,95 \times 10^{-6}$

¹ NR não relatado

Clorovírus com PBCV-1 CVTS1	NR	$1,15 \times 10^{-6}$
Clorovírus infectado com PBCV-1 (afidicolina)	NR	$5,3 \times 10^{-6}$
Clorovírus com PBCV-1 CV01 (Aphidicolin)	NR	$3,5 \times 10^{-6}$
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (KCTC 11935BP)	NR	0,289

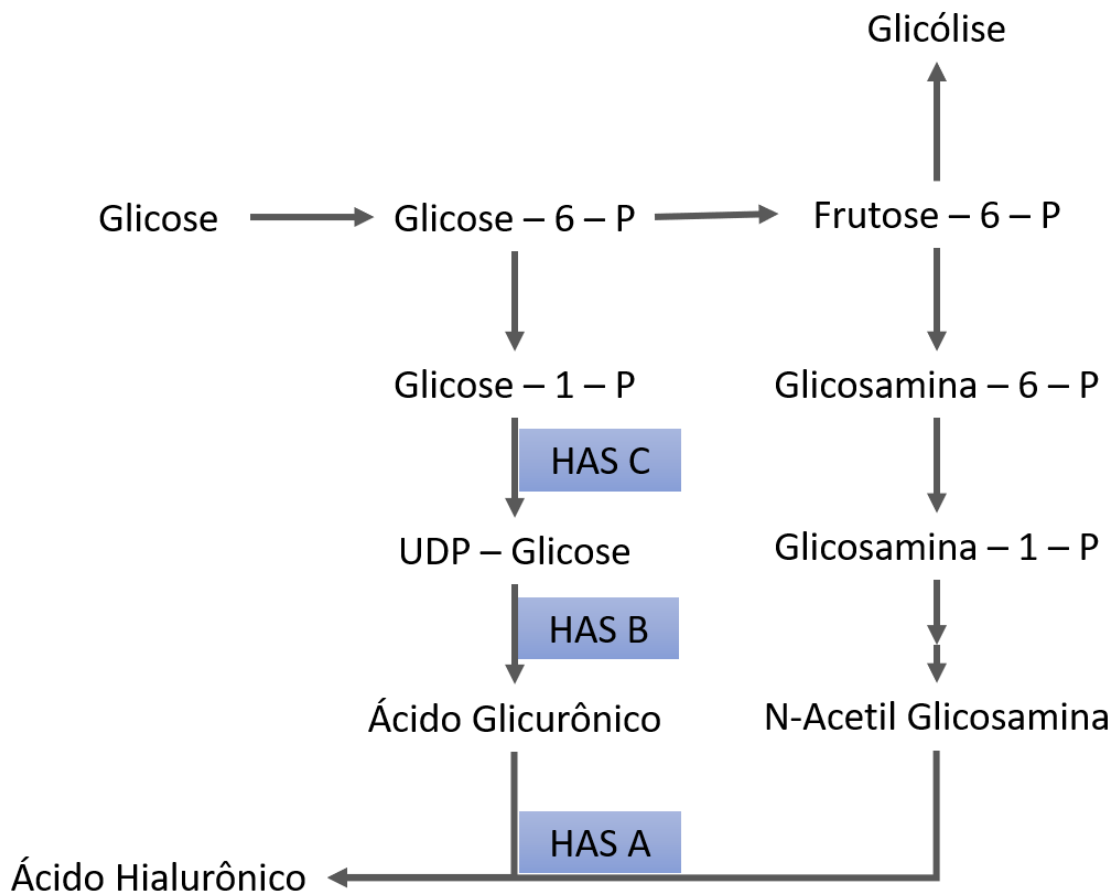


Figura 3 Via metabólica para síntese de ácido hialurônico mostrando todos os substratos necessários para síntese do polímero.

HAS A é a única enzima necessária para a síntese de AH propriamente dita, desde que a célula forneça os intermediários necessários à sua síntese. Existem duas classes de ácido hialurônico sintase (HAS), a HAS A de classe I e HAS A de classe II (Figura 4). A HAS A é uma sintase associada a membrana que possui de seis a oito domínios transmembrana, capaz de polimerizar o AH no lado citoplasmático.(WEIGEL; HASCALL;

TAMMI, 1997). Já a HAS de Classe II é encontrada em *Pasteurella. multocida*, proteína que se ancora à membrana a partir de uma porção C-terminal e sem domínios transmembrana (DEANGELIS, 1999).

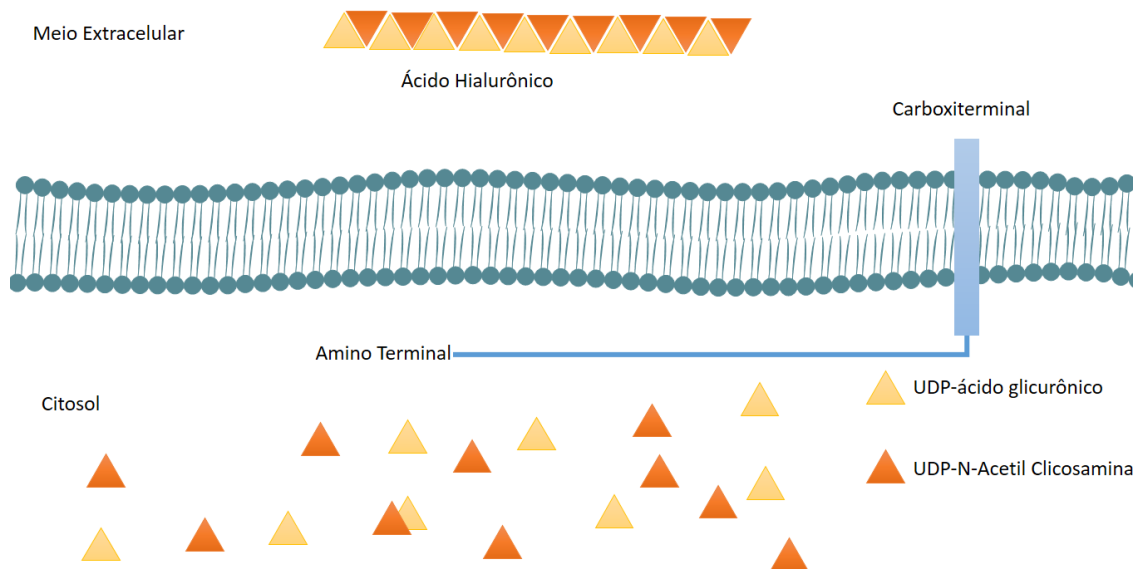


Figura 4 As duas classes conhecidas atualmente de sintases de ácido hialurônico, classe I (a) e classe II(b) que apesar de terem várias diferenças estruturais, possuem em comum domínios transmembrânicos, indicando que estas enzimas estão associadas à membrana das células e catalisam a junção dos dois precursores no lado citoplasmáticos da célula, ao passo que já expulsam para fora a cadeia crescente de ácido hialurônico.

O AH é produzido principalmente por bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes* (Deangelis, 1999) e outros organismos do mesmo gênero, no entanto estes são patogênicos, o que torna o processo de purificação laborioso e de alto custo (Boeriu et al., 2013).

1.2 Mercado e Novas Estratégias Para Produção do Ácido Hialurônico

O AH é um composto de alto valor agregado com demanda crescente pela indústria farmacêutica e cosmética. Apresenta valor de mercado que varia de acordo com

o tamanho e pureza do polímero, podendo alcançar o valor de \$150,00 por grama, com estimativas de mercado em torno de \$ 4,5 bilhões anuais (Grand View Reaserch, 2019).

A demanda por AH é crescente, decorrente das várias aplicações farmacológicas e cosméticas deste composto. Em em cirurgias oftamológicas e viscoscirúrgicas, apresenta vantagens na recuperação de pacientes quando comparados a outros produtos no mercado (Vajpayee et al., 2005). O polímero é utilizado para prevenir aderência de tecidos após cirurgias abdominais (Vrijland et al., 2002) e em osteoartrites para viscosuplementação (Kogan et al., 2007),além de procedimentos estéticos tais como preenchimentos de rugas, aumento de glúteos, preenchimento labial e correção de cicatrizes (Romagnoli & Belmontesi, 2008). Já em 2011 AH era o segundo procedimento não cirúrgico mais utilizado nos EUA, perdendo somente para a aplicação de Botox.

O interesse por microrganismos seguros e não patogênicos para produção de ácido hialurônico fomentou o desenvolvimento de diversos microrganismos com *status GRAS* (do inglês *Generally Regarded as Safe*) por meio de engenharia metabólica, capazes de gerar produtos livres de toxinas, uma vez que os organismos comumente utilizados são em sua maioria patogênicos (DE OLIVEIRA et al., 2016). Nesse sentido, destacam-se as leveduras do gênero *Hansenula*, por possuírem uma série de aplicações na indústria de biocombustíveis e farmacêuticas (CÉSAR et al., 2013; MANFRÃO-NETTO; GOMES; PARACHIN, 2019; THANH, 2012). O ácido hialurônico já foi produzido por vários hospedeiros heterólogos procariotos, conforme exemplificados na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais microrganismos procariotos geneticamente modificados para produção de ácido hialurônico. Retirado e adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2016.

MICROORGANISMO	MODIFICAÇÃO GENÉTICA	PRODUÇÃO (G/ L)
LACTOCOCCUS LACTIS BCRC 12312	Operon contendo HA sintase (<i>HasA</i>) de <i>S. equisubsp. zooepidemicus</i>	0,08
ENTEROCOCCUS FAECALIS OGLRF	Transposon 916 mutagênese insercional	0,002-0,69
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ATCC 13032 PJH174.1	Foi subclonado em um vetor de transporte de plasmídeo (pAT19 e pPD41)	Entre 0,3 e 0,4
AGROBACTERIUM SP ATCC31749	Expressão de <i>HasA</i>	~ 1,0
	Coexpressão da HA sintase de <i>Pasteurella multocida</i> e UDP-glicose desidrogenase de <i>Escherichia coli</i>	~ 3,0

ESCHERICHIA COLI MG1655 SSEABC	Gene de sse HasA com sequência proteica idêntica de seHAS de <i>Streptococcus equisimilis</i>	0,148 (48 h)
ESCHERICHIA COLI TOP10 / (PMBAD-SSEABC)	Usado como cepa de controle na triagem de bibliotecas, abrigando um único plasmídeo e as cópias cromossômicas de rpoD e rpoS de tipo selvagem	0,510
ESCHERICHIA COLI TOP10 / (PMBAD-SSEABC, PHACM-RPOS)	Com uma cópia extra de rpoS unmutated em pHACM;	0,696
STREPTOMYCES ALBULUS PJHA4	gene hasA de 29 <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	6,2
BACILLUS SUBTILIS	Operon contendo HA sintase (<i>HasA</i>) de <i>Streptococcus</i> e tuaD controlada por promotores indutivos	6,8

Os eucariotos vem sendo modificados para a produção de ácido hialurônico, como exemplo, a levedura *Pichia (Ogataea) pastoris* modificada por Jeong et al. com a inserção dos genes para a síntese dos precursores de ácido hialurônico, fazendo com que a cepa sintetizasse esse composto obtendo rendimento de 0,8 a 1,7 g/L das estirpes recombinantes em 1L de cultura de fermentação (JEONG; SHIM; KIM, 2014a).

1.3 *Ogataea (Hansenula) polymorpha*

A levedura metilotrófica *Ogataea (Hansenula) polymorpha* é conhecida por ser capaz de fermentar diversas fontes de carbono como glicose, celobiose, xilose e glicerol em etanol (KATA et al., 2016; RYABOVA et al., 2003). Além disso, é a levedura mais termotolerante conhecida, com uma temperatura de fermentação de 50 °C (ISHCHUK et al., 2009) o que pode trazer vantagem em algumas aplicações industriais (GELLISSEN, G, 2000). É um organismo modelo para análise de funcionamento de peroxissomos serviu de base para descrição do processo de pexofagia (LEAO; KIEL, 2003).

Cepas recombinantes de *O. polymorpha* vêm sendo desenvolvidas para diversas aplicações (ISHCHUK et al., 2009), dentre as modificações Kata e colaboradores. promoveram a superexpressão dos genes PDC1 e ADH1 para aumento da conversão de

glicerol em etanol (KATA et al., 2016). Além disso, esforços significativos vêm sendo feitos na produção de proteínas heterólogas em *O. polymorpha* devido as suas eficientes vias de secreção, maquinário efetivo de glicosilação e sistemas de expressão fortemente controlados (GELLISSEN, Gerd, 2002; MANFRÃO-NETTO; GOMES; PARACHIN, 2019). Estes estudos sugerem que a levedura é uma importante plataforma para o desenvolvimento de linhagens capazes de produzir compostos de alto valor agregado a partir de métodos de cultivo com fontes nutricionais de baixo custo, como xilose, sacarose e glicerol.

As pesquisas científicas desenvolvidas com *O. polymorpha* têm utilizado três as linhagens, que possuem origens distintas e suas inter-relações não estão esclarecidas. A linhagem CBS4732 (CCY38-22-2; ATCC34438; NRRL-Y-5445) e a linhagem DL-1 (NRRL-Y-7560; ATCC26012) foram isoladas em 1993 por Levine; já a linhagem NCYC495 (CBS1976; ATAA14754, NRLL-Y-1798), isolada de bagaço de produção de suco de laranja, foi inicialmente designada por Wickerham em 1951 como *Hansenula angusta* (Wickerham, 1951).

1.4 *Kluyveromyces lactis*

A levedura *Kluyveromyces lactis* é um dos principais microrganismos presentes em processos lácteos onde o principal substrato é a lactose (SPOHNER et al., 2016). Inicialmente esta levedura era utilizada como fonte da enzima β -galactosidase, responsável por hidrolisar a lactose e, assim utilizada amplamente na produção de alimentos livres em lactose (SAQIB et al., 2017). Além da indústria alimentícia, também são utilizadas na indústria farmacêutica para a produção de enzimas (SPOHNER et al., 2016), ácido ascórbico (CÉSAR et al., 2013) e proteínas heterólogas (VAN OUYEN et al., 2006). As proteínas produzidas em *K. lactis* apresentam um padrão eucariótico de glicosilação, o que as torna excelentes candidatas a superexpressão de genes eucariotos.

2. Objetivo Geral

Desenvolver leveduras capazes de sintetizar ácido hialurônico.

3. Objetivos Específicos

- Construção de cepas recombinantes de *Ogataea polymorpha* para superprodução de ácido hialurônico à partir das inserções das isoformas do gene hasA, e dos genes hasB e hasC.
- Construção de cepa recombinante de *Kluyveromyces lactis* para expressão de hasB (UDP-glicose desidrogenase)

4. Material e Métodos

4.1 Lista de oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Tabela de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência 5' → 3'	Sítio de restrição adicionado
HASA F	CCCAAGCTTAAAAATGCACTGTGAAA GATTCTTGTGTATCTTGA	HindIII
HASA R	AAAGTCGACTCAAACATCCAAGACCA TATCATATTGTTGACC	Sall
HASAP F est2	TTTAAGCTTATGAATACCTTATCTCAA GC	HindIII
HASAP R est2	AAAGTCGACTTTAGGCCTTACAATGT GATTGAAT	Sall
HASB F est 2	aaaAAGCTTAATGTTTCAGATCAAGAAG ATTTGTTGTA	HindIII
HASB R est 2	AAAGTCGACTTACACACGTTGCTTC	Sall
Cassete HASB F	AAACCGCGGAGCTCTCGAGTTTATCAT TATCAATACTGC	SacII
Cassete HASB R	AAACCGCGGGCAAATTAAGCCTTCG AGCGTCCC	SacII
HASC F	AAAGGATCCAAAAATGAGTAAGCACG CCAAGTCCC	BamHI
HASC R	AAAATCGATTTAGTGTCCAAGATGGT CAAATTGCC	ClaI
Cassete HASC F	TAAAGCTCCAAAATGTTTCTACTCCTT TTTTACTCTTC	BluntEnd (PsiI)
Cassete HASC R	TAAGCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCC	BluntEnd (PsiI)

<i>HASB GPD F</i>	AAACCTNAGGAGCTCTCGAGTTTATCA	Bsu36I
	TTATCAATACTGC	
<i>HASB GPD R</i>	AAACCTNAGGGCAAATTAAGCCTTC	Bsu36I
	GAGCGTCCC	

4.2 PCR

Todas as reações de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dos genes, cassetes e plasmídeos relatados foram feitas em microtubos de 0,2 mL contendo 2 µL de tampão de PCR concentrado 10 vezes (KCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,4; Triton X-100 1%); 0,6 µL de MgCl₂ 25 mM; 1 µL de oligonucleotídeo iniciador *forward* 10 µM; 1 µL de oligonucleotídeo iniciador *Reverse* 10 µM; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 1 unidade ou 0,2 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Phoentria); 10 ng de DNA molde a ser amplificado e água ultra pura deionizada até completar volume final de 20 µL. Os microtubos contendo as reações são inseridos em termociclador com os seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 95 °C por 7 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, seguido de temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 30 segundos, seguido por 72 °C por 2,5 minutos; 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos e resfriamento indefinidamente à 12 °C.

4.3 Transformação dos Plasmídeos em células de *Escherichia coli* e posterior purificação

Todos os plasmídeos construídos foram replicados em células de *Escherichia coli* após a reação de ligação dos insertos com vetores. Foram utilizados 100 µL de células ultra competentes de *E. coli* cepa XL10-Gold® congeladas a -80 °C em tubos de 1,5 mL que foram descongeladas por 10 minutos em banho de gelo, após descongelamento, foram misturados às células 10 µL de DNA plasmidial das construções. O tubo contendo células e DNA foi incubado por 30 minutos em gelo, após isto as células foram retiradas do gelo e imediatamente incubadas em banho de água à 42 °C por 90 segundos e então recolocadas imediatamente em banho de gelo por 2 minutos. Foram adicionados 900 µL de meio SOC e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação 200 µL de

células foram plaqueadas em meio SOC ágar seletivo contendo ampicilina (100 µL/mL) e as placas foram colocadas invertidas em incubadora à 37 °C por 24 horas. O restante de células foi repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol até concentração final de 15% e armazenado à -80 °C indefinidamente. Todos os processos descritos foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

4.4 Tratamento com Endonucleases de Restrição

O tratamento por endonucleases de restrição dos plasmídeos foi feito simultaneamente com as reações de desfosforilação, cujo objetivo foi impedir que os plasmídeos se religuem a eles mesmos ao invés de se ligarem ao gene de interesse, quando colocados sob ação da enzima T4 DNA ligase. Já as reações de digestão de genes, cassetes e produtos de PCR lineares foram realizadas sem o processo de desfosforilação.

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL contendo 1 µg de DNA plasmidial ou gênico, 2 µL de solução tamponante “*Green Fast Digest Buffer*” 10x concentrado (*Thermo Fisher Scientific*®), 1 µL de enzima de restrição (HindIII ou SacII ou SapI ou Sall) “*Fast Digest*” (*Thermo Fisher Scientific*®), 1 µL da enzima fosfatase “*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*” (*Thermo Fisher Scientific*®) nos casos onde há reação de desfosforilação e água ultra-purificada deionizada até completar volume final de 20 µL. Nos casos em que a digestão de DNA é feita com 2 enzimas de restrição, 1 µL da segunda enzima também é adicionada ao sistema de digestão, totalizando a ação de até 3 enzimas no sistema. Após preparada a reação de 20 µL, o microtubo foi incubado por 2 horas em incubadora à 37 °C e, após este tempo o microtubo foi aquecido a 80 °C por 15 minutos para a inativação das enzimas.

4.5 Purificação de DNA

Todo o DNA obtido após PCR e tratamentos com endonucleases de restrição foi purificado com o kit “*GeneJET PCR Purification Kit*” (*Thermo Fisher Scientific*®), seguindo as recomendações do manual do fabricante. Ao final do processo, para cada 1 µg de DNA tratado foram recuperados 800 ng da amostra para serem utilizadas em outras etapas.

4.6 Ligação com T4 DNA ligase

Todas as reações de ligação foram feitas com a enzima T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*®) seguindo o protocolo à seguir: Em um microtubo de 0,2 mL foram inseridos 100 ng de DNA vetor digerido linearizado desfosforilado; 300 ng de DNA inserto digerido; 2 µL de “T4 DNA Ligase Buffer” (*Thermo Fisher Scientific*®) concentrado dez vezes (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM (pH 7,8 a 25 °C); 2 µL de solução PEG 4000 à 50% (w/v); 2 µL de enzima T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*®) e água ultra pura deionizada até completar volume final de 20 µL. O microtubo foi incubado por 16hs à 22 °C em seguida foi diretamente utilizado em transformação de células de *E. coli*.

4.7 Extração de DNA plasmidial de células de *Escherichia. coli* (*Thermo Fisher Scientific*®)

Foram selecionadas aleatoriamente 10 colônias escolhidas aleatoriamente de *E. coli* após a transformação. Em seguida essas células foram colocadas em 10 mL de meio de cultura SOC ou LB seletivo contendo antibiótico adequado ao plasmídeo da construção, as células foram incubadas em agitador orbital de frascos a 37 °C e 400 G por 16 horas. Após este tempo, os plasmídeos foram purificados da cultura celular pela utilização do kit “*GeneJET Plasmid Miniprep Kit*” (*Thermo Fisher Scientific*®) seguindo recomendações do manual do fabricante. Ao final foram obtidos 50 µL de plasmídeo purificado com concentração em média de 400 ng/ µL.

4.8 Construção de Leveduras produtoras de ácido hialurônico

A fim de otimizar a produção de ácido hialurônico em *O. polymorpha* e *K.lactis*, foram construídos 4 plasmídeos contendo cada um uma das quatro isoformas ou versões do gene hasA, que codificam a mesma enzima, a ácido hialurônico sintase. As quatro isoformas incluem os genes hasA1, hasA2, hasA3 e hasAP, sendo os três primeiros genes presentes em *Homo s. sapiens* e que codificam as três enzimas ácido hialurônico

sintase presentes em seres humanos. Cada uma das isoformas pode apresentar características diferentes relacionadas ao tamanho da cadeia polimérica do ácido hialurônico. O último, presente na bactéria patogênica *Pasteurella multocida*, descrita como uma bactéria produtora de ácido hialurônico, possui uma HAS distinta das outras HAS conhecidas, tanto em estrutura, como em mecanismo de ação (DEANGELIS, 1998).

Os genes codificantes para as enzimas hasA1(AC018755.3), hasA2 (AC022909.13), hasA3 (AC009027.10), hasAP (A0A379BBE3) e hasB foram obtidos do banco de dados de sequências genômicas NCBI e códon-otimizados para a leveduras por uma empresa especializada (GeneOne).

4.9 Síntese dos plasmídeos contendo o gene *hasA* (pBSK-*hasA1*, pBSK-*hasA2*, pBSK-*hasA3* e pBSK-*hasAP*) e do gene *hasB* (pBSK-*hasB*)

Os genes codificantes para as enzimas hasA1, hasA2, hasA3, hasAP e hasB foram obtidos do banco de dados de sequências genômicas NCBI e códon-otimizados para leveduras pela GENONE

Foram sintetizados cinco plasmídeos, dos quais quatro continham uma das isoformas de hasA e o quinto do gene hasB. Foram denominados pBSK-*hasA1* contendo o gene hasA1 (Figura 5a), pBSK-*hasA2* contendo o gene hasA2 (Figura 5b), pBSK-*hasA3* contendo o gene hasA3 (Figura 5c) e pBSK-*hasAP* contendo o gene hasAP (Figura 5d).

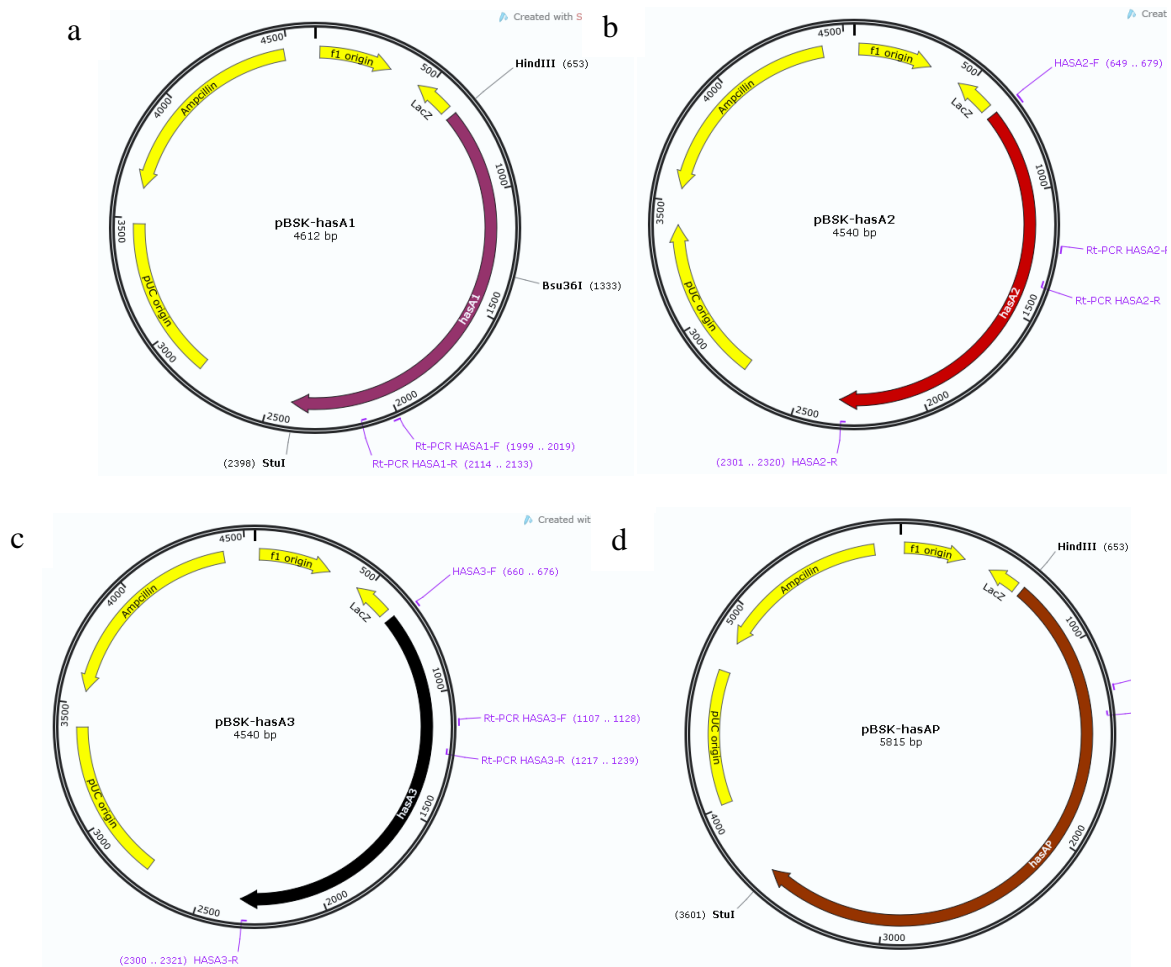


Figura 5 Plasmídeos contendo os genes sintéticos após otimização de códons para leveduras. Nos plasmídeos apresentados incluem uma origem de replicação para propagação em células de *Escherichia coli* (pUC origin); um gene de resistência ao antibiótico ampicilina para seleção de células de *Escherichia coli* clonadas (Ampicillin). Em (a) é apresentado o plasmídeo sintético pBSK-hasA1 (4612 pb). Em (b) é mostrado o plasmídeo sintético pBSK-hasA2 (4540 pb). Em (c) é mostrado o plasmídeo sintético pBSK-hasA3 (4540 pb). Em (d) é apresentado o plasmídeo sintético pBSK-hasAP (5815 pb).

Cada plasmídeo foi sintetizado de modo a possuir o gene de interesse, uma origem de replicação para replicação em células de *E. coli* e um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, para a seleção das células clonadas, ou seja, após a inserção dos referidos plasmídeos em células de *E. coli*, é esperado que apenas as bactérias que conseguiram captar o plasmídeo tenham a capacidade de sobreviver em um meio contendo o antibiótico ampicilina.

4.10 Extração dos genes *hasA* e inserção no plasmídeo pHIPZ18 de modo a formar as construções pHIPZ18+*hasA1*, pHIPZ18+*hasA2*, pHIPZ18+*hasA3* e pHIPZ18+*hasAP*.

Os plasmídeos pBSK-*hasA1*, pBSK-*hasA2*, pBSK-*hasA3* e pBSK-*hasAP* foram submetidos a uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para extração por amplificação dos genes *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasAP*. Os plasmídeos pBSK-*hasA1*, pBSK-*hasA2*, pBSK-*hasA3* e pBSK-*hasAP*, foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores *hasA1-F*, *hasA1-R*, *hasA2-F*, *hasA2-R*, *hasA3-F* e *hasA3-R*.

Os oligonucleotídeos adicionaram, durante a amplificação por PCR, os sítios de restrição para as enzimas HindIII e SalI. Nos oligonucleotídeos com nomenclatura terminada em F (*Foward*) foram inseridos os sítios para Hind III, já o sítio para SalI nos oligonucleotídeos com nomenclatura terminada em R (*Reversos*). Após amplificado, o gene da isoforma de *hasA* foi purificado, digerido com as enzimas HindIII e SalI e submetido à ligação pela enzima T4 DNA ligase, com o plasmídeo pHIPZ18 previamente digerido com HindIII e SalI.

Os genes foram purificados em seguida, e colocados em um sistema de ligação com enzima T4 DNA ligase com o plasmídeo pHIPZ18 previamente digerido com HindIII e SalI. O resultado da ligação é transformado em células de *E. coli* crescidas em meio contendo antibiótico para seleção de clones transformantes. Após o crescimento, as células de *E. coli* foram lisadas de modo a obter os plasmídeos pHIPZ18+*hasA1*, pHIPZ18+*hasA2*, pHIPZ18+*hasA3* e pHIPZ18+*hasAP* em grandes quantidades.

4.11 Construção do cassete de expressão do gene *hasB*.

O gene *hasB* foi extraído do plasmídeo pBSK-*hasB* através de digestão utilizando as enzimas BamHI e SalI e, em seguida, ligado ao plasmídeo p424-GPD, também previamente digerido com as mesmas duas enzimas. A ligação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase, resultando no transformado em células de *Escherichia coli* crescidas em meio contendo antibiótico para seleção de clones transformantes. Após o

crescimento, as células de *E. coli* foram lisadas e os plasmídeos p424-GPD+*hasB* (Figura 6) em grandes quantidades foram extraídos.

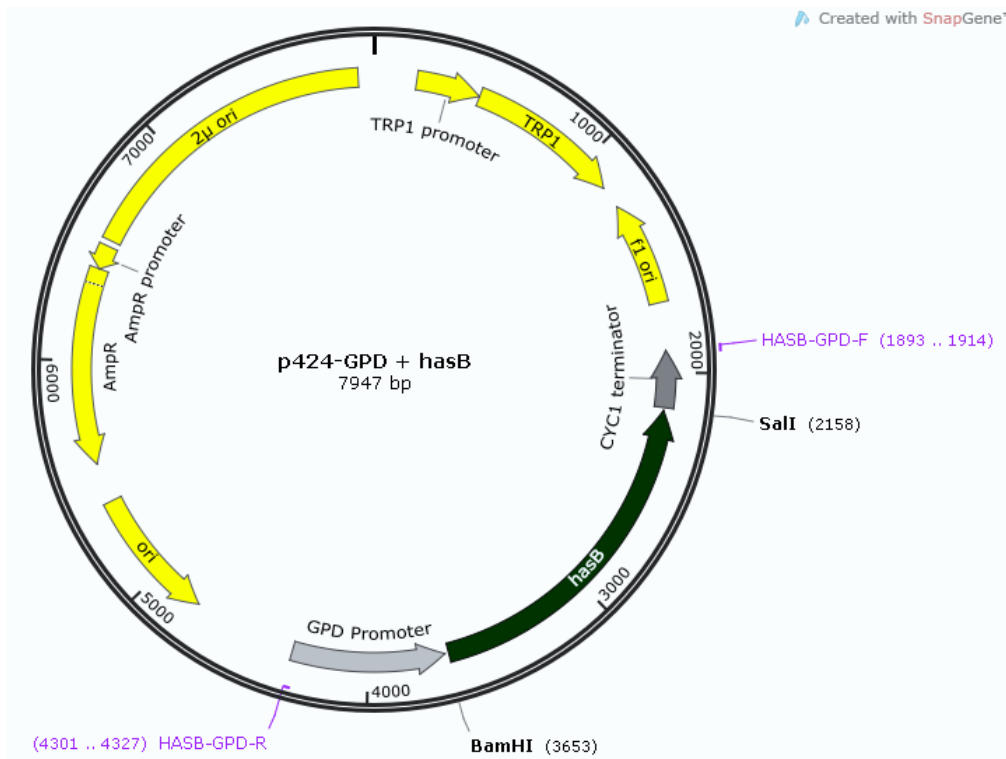


Figura 6 Plasmídeo contendo a construção de *hasB* sob controle do promotor GPD.

4.12 Purificação do gene *hasC* por PCR e montagem utilizando o plasmídeo p424 contendo o promotor TEF.

O gene *hasC* foi o único gene utilizado em construções nesta tecnologia que não veio de fontes sintéticas, visto que o mesmo ocorre naturalmente no genoma de *O. polymorpha* e pode ser amplificado *in silico* da própria levedura. Para tanto, células de *O. polymorpha* foram lisadas e todo o seu DNA genômico purificado. O DNA purificado foi utilizado em uma reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores *hasC*-F e *hasC*-R, sintetizados por empresa especializada utilizando como molde o genoma sequenciado de *O. polymorpha* presente em bancos de dados genômicos. O oligonucleotídeo iniciador *HASC*-F foi sintetizado contendo um sítio para a enzima BamHI em sua extremidade 5' e o oligonucleotídeo iniciador *hasC*-R contendo um sítio para enzima XhoI em sua extremidade 5'. Dessa forma, na amplificação do gene *hasC* foi realizada durante a PCR, onde foram adicionados um sítio para BamHI e um sítio para XhoI nas extremidades 5' e 3' da região codificadora, respectivamente. O gene *hasC* foi digerido pela utilização das

enzimas BamHI e XhoI e em seguida ligado ao plasmídeo p424-TEF, também previamente digerido com as mesmas enzimas. A ligação é realizada pela utilização da enzima T4 DNA ligase, na qual o resultado da ligação é transformado em células de *Escherichia coli* crescidas, em meio contendo antibiótico para seleção de clones transformantes. Após o crescimento, as células de *E. coli* foram lisadas e os plasmídeos p424-TEF+*hasC* (Figura 7) foram extraídos.

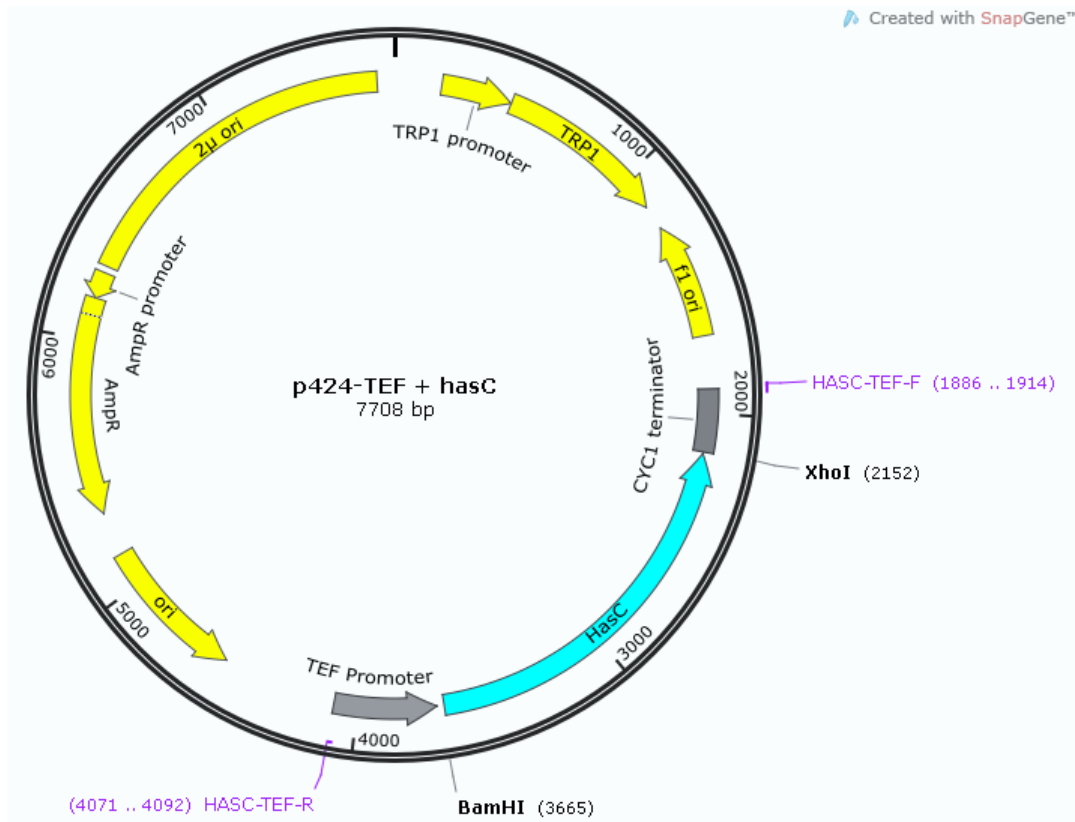


Figura 7 Plasmídeo contendo a construção de *hasC* sob controle do promotor TEF.

4.13 Introdução de *hasB* aos plasmídeos pHIPZ18+*hasA*

O cassete *hasB* (Promotor GPD + gene *hasB* + terminador CYC1) e o cassete *hasC* (Promotor TEF+gene *hasC*+terminador CYC1) foram amplificados, respectivamente, dos plasmídeos p424-GPD+*hasB* e p424-TEF+*hasC* através de PCR com

o uso dos oligonucleotídeos iniciadores *hasB-GPD-F* e *hasB-GPD-R* para o cassete *hasB*, e oligonucleotídeos iniciadores *has-TEF-F* e *hasC-TEF-R* para o cassete *hasC*.

Os oligonucleotídeos iniciadores *hasB-GPD-F* e *hasB-GPD-R* foram sintetizados contendo um sítio para a enzima *SacII* em suas extremidades 5'. Desta forma, na amplificação do cassete *hasB* durante a PCR foram adicionados um sítio para *SacII* e um sítio para *SapI* nas extremidades 5' e 3', das respectivas regiões codificantes.

O tratamento com endonucleases de restrição nos produtos de PCR para extração do cassete *GPD+hasB*. Após a digestão foi feita a ligação do cassete de *hasB* aos plasmídeos *pHIPZ18* contendo as isoformas de *hasA*, formando os plasmídeos *pHIPZ18+hasAP+hasB* (Figura 8a), *pHIPZ18+hasA1+hasB* (Figura 8b), *pHIPZ18+hasA2+hasB* (Figura 8c) e *pHIPZ18+hasA3+hasB* (Figura 8d).

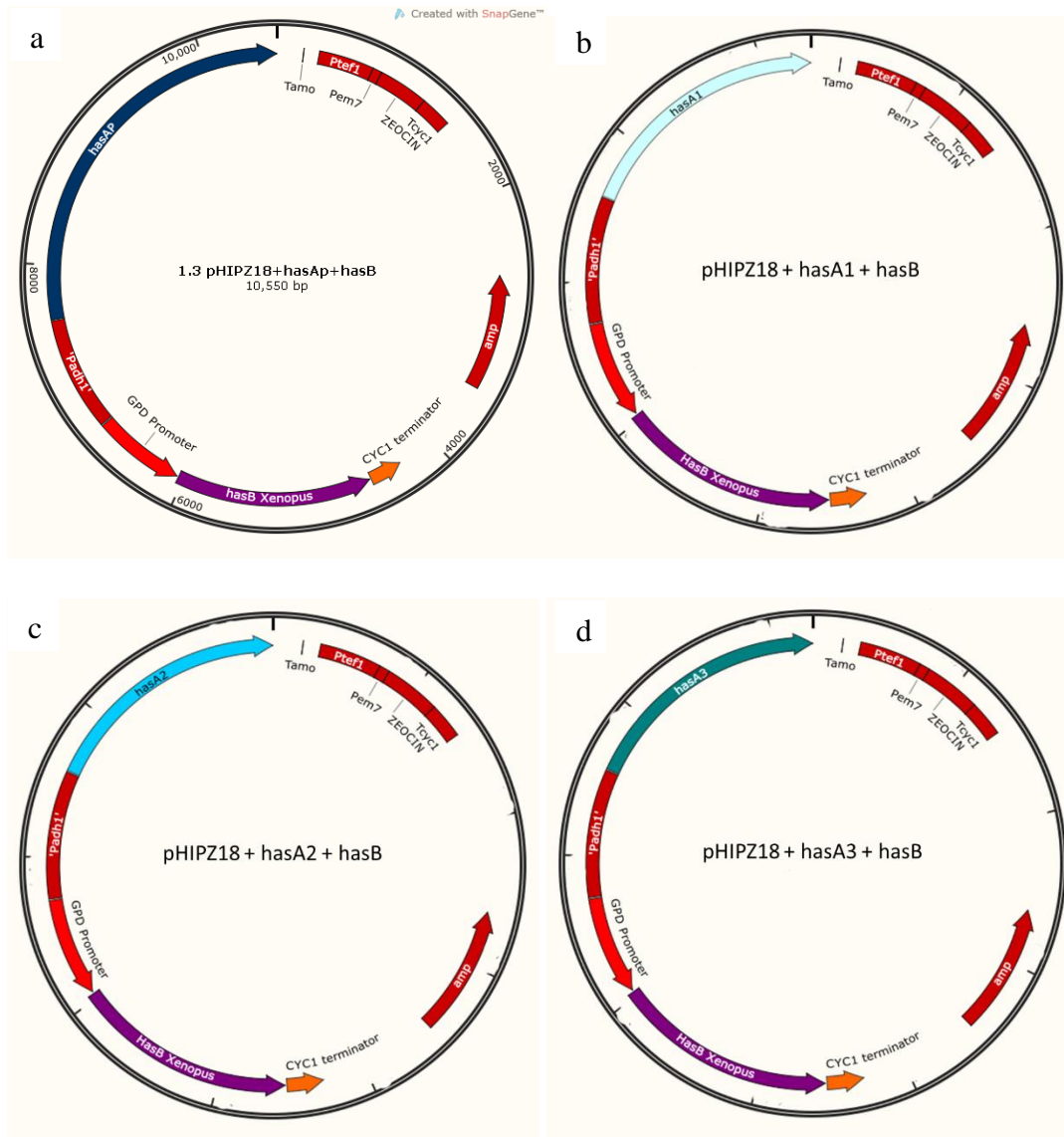


Figura 8 Plasmídeo contendo a construção pHIPZ18+hasA+hasB.

4.14 Introdução de hasC aos plasmídeos pHIPZ18+hasA+hasB,

Quatro diferentes plasmídeos contendo as isoformas hasA1, hasA2, hasA3 e hasAP, receberam o cassete contendo o gene hasB. Para esta execução, o cassete hasB purificado foi digerido com a enzima SacII, purificado novamente e submetido a reações de ligação da enzima T4 DNA ligase, com os plasmídeos pHIPZ18+hasA1, pHIPZ18+hasA2, pHIPZ18+hasA3 e pHIPZ18+hasAP, todos previamente também digeridos com SacII e purificados. Os resultados das ligações foram transformados em células de *Escherichia coli*, crescidas em meio contendo antibiótico para seleção de clones

transformantes. Após o crescimento, as células de *E. coli* foram lisadas e os plasmídeos pHIPZ18+*hasA*+*hasB*, pHIPZ18+*hasA1*+*hasB*, pHIPZ18+*hasA2*+*hasB* e pHIPZ18+*hasA3*+*hasB* foram separadamente extraídos. Os plasmídeos supracitados estão respectivamente representados na Figura 8.

4.15 Inserção dos plasmídeos contendo os genes codificadores para a via de síntese de AH em *O. polymorpha*

Após a finalização das construções de plasmídeos pHIPZ18 contendo os genes *hasA*, *hasB* e *hasC*, os mesmos foram transformados na levedura *O. polymorpha*, utilizando um protocolo de transformação descrito por Berardi et al. (BERARDI; THOMAS, 1990). Foram transformadas células de leveduras com plasmídeos contendo apenas os genes *hasA* e *hasB*, bem como plasmídeos contendo *hasA*, *hasB* e *hasC*, de modo a evidenciar como o gene *hasC* afeta a produção de ácido hialurônico.

O protocolo de transformação de *O. polymorpha* foi estabelecido utilizando os vetores contendo genes codificadores da via metabólica de síntese de ácido hialurônico. A *O. polymorpha* foi inoculada em meio líquido *yeast protein dextrose* (YPD) a 37 °C, e posteriormente aferida a densidade ótica (OD) da cultura em comprimento de onda de 600 nm (nanômetros), utilizando um espectrofotômetro. Quando a densidade ótica alcançou o valor de 0,8 a cultura foi retirada de crescimento, feita a centrifugação do meio de cultura contendo as células de *O. polymorpha* utilizando 3000x g por 5 min como parâmetro base de ajuste para precipitação das células. Concomitantemente, foi fervido esperma de salmão por 5 min em água a 97 °C, que funciona como carreador de DNA. Descartou-se o sobrenadante ao fim da centrifugação, as células precipitadas foram lavadas com 5 mL de água destilada estéril a 4 °C e feita nova centrifugação a 3000x g por 5 min a 4 °C, com descarte do sobrenadante. O procedimento anterior foi repedido até a eliminação de vestígios do meio de cultura. Após centrifugação, as células foram suspensas em 5 mL solução estoque de acetato de lítio (composto por: 51 g de acetato de lítio (SIGMA L6883) em 450 mL de água destilada, com o volume ajustado para 500 mL). As células foram centrifugadas por 5 min a 3000x g, e o sobrenadante descartado. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de mix acetato de lítio (composto por: 50 mL de acetato de lítio 1 M, 50 mL de TE (tris 0,05M e EDTA 0,1M)).

A transformação foi iniciada com o preparo de um tubo de centrifugação contendo 5 µg do vetor pHIPz18, montado com uma das quatro isoformas do gene *hasA* e os cassetes *hasB* e *hasC*, 10 µL do esperma de salmão, 100 µL do mix acetato de lítio com as células. Foram adicionados 700 µL de mix PEG, (composto por: 40 g de polietilenoglicol 3350 (SIGMA P3640), 10 mL de TE, 10 mL de acetato de lítio 1 M, o volume é ajustado para 100 mL). A solução foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, passado esse tempo, adicionou-se 48 µL de DMSO, agitando por 10 segundos e incubando por 15 min a 56 °C. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura YPD e incubado a 37 °C por 4 horas. Foram inoculados 100 µL em placas contendo meio de cultura YPD-ágar e zeocina para a seleção, incubadas por 72 h a 37 °C.

As colônias que cresceram em novas placas contendo antibiótico zeocina foram replicadas e a confirmação da presença dos genes da construção do plasmídeo por PCR de colônia foi realizada utilizando os parâmetros da reação para amplificação das quatro isoformas de *hasA* e para os cassetes *hasB* e *hasC*.

4.16 Confirmação de Integração dos genes (PCR de Colônia) e seleção dos clones positivos.

Foram selecionadas aleatoriamente a partir de placas da transformação da etapa anterior, 20 colônias por placa. Cada colônia foi repassada, com o auxílio de um palito estéril, a um microtubo de 0,4 mL contendo 20 µL de água miliQ. Os microtubos foram agitados de modo a suspender as células e em seguida foram colocados em banho de água à temperatura entre 96 °C e 100 °C por 10 minutos. Após este tempo, os microtubos foram passados a um banho de gelo e desta suspensão 1 µL foi retirado e utilizado como DNA *template* para a realização de PCR, como descrito no protocolo base, de modo a confirmar se os genes *hasA*, *hasB* e *hasC* estão presentes no genoma de *O. polymorpha*. A PCR de colônia foi feita utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene *hasA*, *hasB* e *hasC*.

Após os resultados da PCR, as colônias que apresentaram os genes integrados foram repassadas, com o auxílio de palito de madeira, à 5 mL de meio YPD em um tubo falcon de 50 mL e colocadas a 30 °C sob agitação de 200 RPM por 48 horas. Após os

crescimento até OD₆₀₀ de 1,4 foram feitas alíquotas de 1 mL desta suspensão celular, que foi repassada a um tubo criogênico, misturado com glicerol até concentração final de 20% e armazenado à -80 °C indefinidamente.

4.17 Construção de hasB em pKLAC2 (NEB)

O plasmídeo pKlac2 (New England BioLabs Inc.®) é um plasmídeo comercial utilizado para expressão gênica em células *Kluyveromyces lactis*. Foi utilizado neste estudo, como acceptor do cassete hasB para construções posteriores de um sistema de expressão de ácido hialurônico em leveduras *Kluyveromyces lactis*.

O cassete de expressão contendo o gene hasB sob controle do promotor GPD foi utilizado para esta construção, e foi inserido no pKlac2, formando a construção pKlac2+hasB, ambos digeridos previamente com a enzima Bsu36I.

O cassete hasB (Promotor GPD+gene hasB+terminador CYC1) foi extraído do plasmídeo p424-GPD+hasB por meio de PCR com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores HASB-GPD-F e HASB-GPD-R. Os oligonucleotídeos iniciadores hasB-GPD-F e hasB-GPD-R foram sintetizados contendo um sítio para a enzima Bsu36I em suas extremidades 5', de forma que ao ser realizada a amplificação do cassete hasB durante a PCR, são adicionados um sítio para Bsu36I em ambas as extremidades (5' e 3') do cassete de expressão. O cassete hasB purificado foi tratado com endonuclease de restrição Bsu36I, purificado novamente e submetido à ligação com T4 DNA ligase com o plasmídeo pKlac, previamente tratados com Bsu36I e purificados. Os resultados das ligações foram transformados em células de *E. coli* crescidas em meio contendo antibiótico ampicilina para seleção de clones transformantes. Após o crescimento, as células de *E. coli* foram lisadas e os plasmídeos pKlac + hasB foi extraído, gerando esta construção.

5. Resultados e Discussão

Existem diversos estudos que relacionam *O. polymorpha* modificadas para expressão heteróloga, sendo um deles realizado por Kurylenki et al., onde foi feita a construção de linhagens desta levedura para o aumento da produção de etanol a partir de xilose (KURYLENKO et al., 2014). Hong et al. fizeram o aprimoramento da produção de etanol a partir de glicerol em leveduras de *O. polymorpha* que expressam os genes de piruvato descarboxilase e aldeído desidrogenase de *Zymomonas mobilis* (HONG et al., 2010). Entretanto, nenhum trabalho que preveja o desenvolvimento e o uso para a produção de ácido hialurônico ou outros ácidos orgânicos que tenham interesse para o escalonamento industrial ainda havia sido realizado.

A construção de sistemas de expressão heterólogo para a produção de ácido hialurônico utilizando células bacterianas como *Escherichia coli* (YU; STEPHANOPOULOS, 2008) e *Lactococcus lactis* (PRASAD; JAYARAMAN; RAMACHANDRAN, 2010) ou ainda de leveduras (JEONG; SHIM; KIM, 2014b), tem sido feita ao longo dos últimos 10 anos. Os estudos são voltados para a modificação genética destes organismos sempre contendo os genes hasA com ou sem os genes hasB, hasC e hasD (UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase), não utilizado neste trabalho. Os autores observaram que as melhores produções de ácido hialurônico aconteciam quando os genes hasA, hasB e hasC eram co-expressos na célula, indicando que a produção da molécula depende da concentração dos substratos e conseqüentemente das enzimas que os produzem, corroborando a estratégia definida neste estudo.

5.1 Montagem dos Cassetes de expressão e do Plasmídeo para integração em *O. polymorpha*.

5.1.1 pHIPZ18+hasA

Era esperado que após o crescimento as células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos contendo as construções as quatro isoformas de hasA se apresentassem como observado na Figura 9.

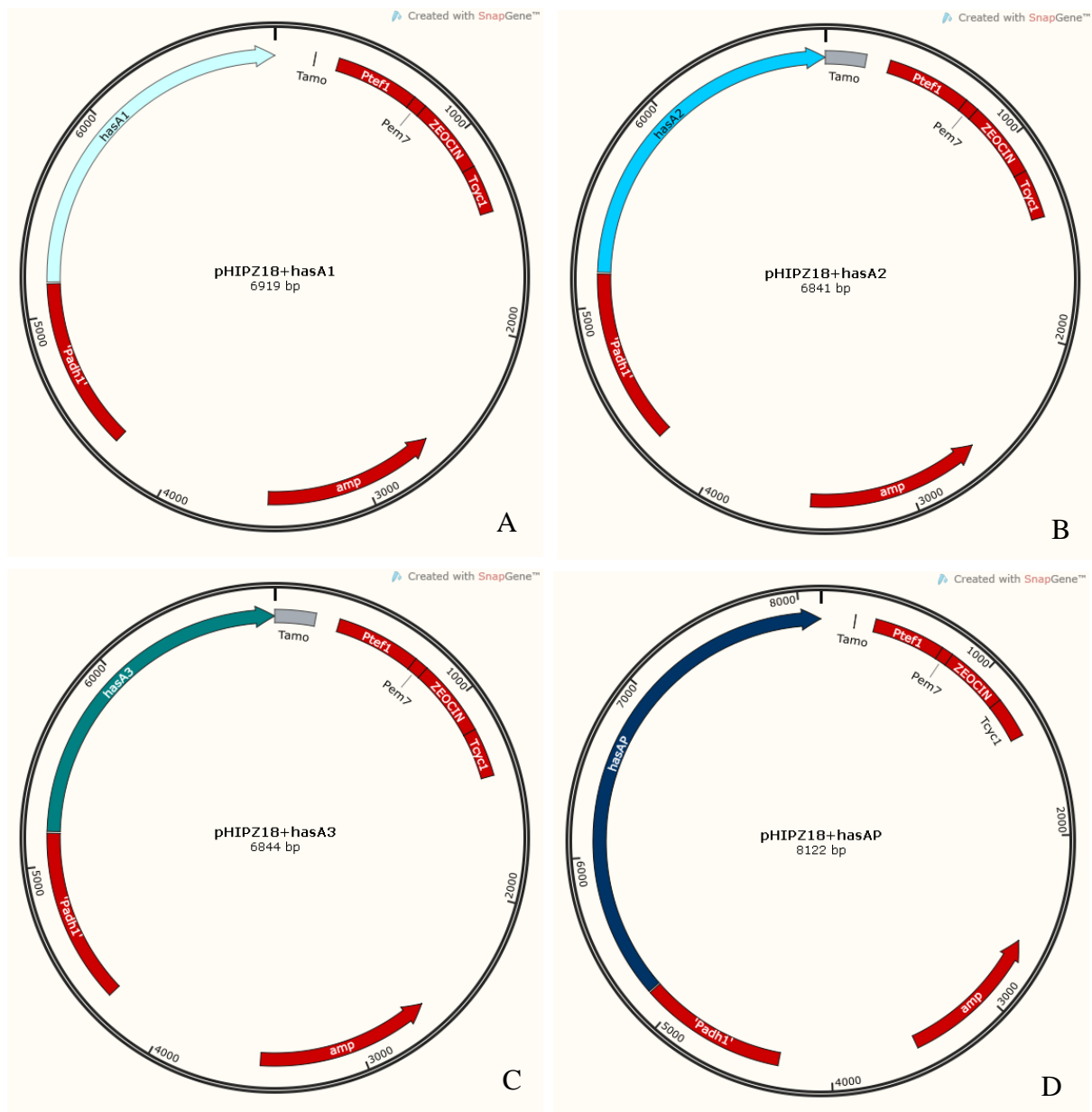


Figura 9 Construções esperadas das isoformas de hasA em pHIPZ18.

As construções de plasmídeos contendo as diferentes isoformas de hasA (hasA1, hasA2, hasA3 e hasAP) foram verificadas, entretanto, apenas as construções com hasA2 e hasAP foram confirmadas. A confirmação das inserções foi observada em gel de agarose após amplificação dos genes com os respectivos oligonucleotídeos, após miniprep de colônias tanto para pHIPZ18+hasA2 (Figura 10), e pHIPZ18+hasAP (Figura 11).

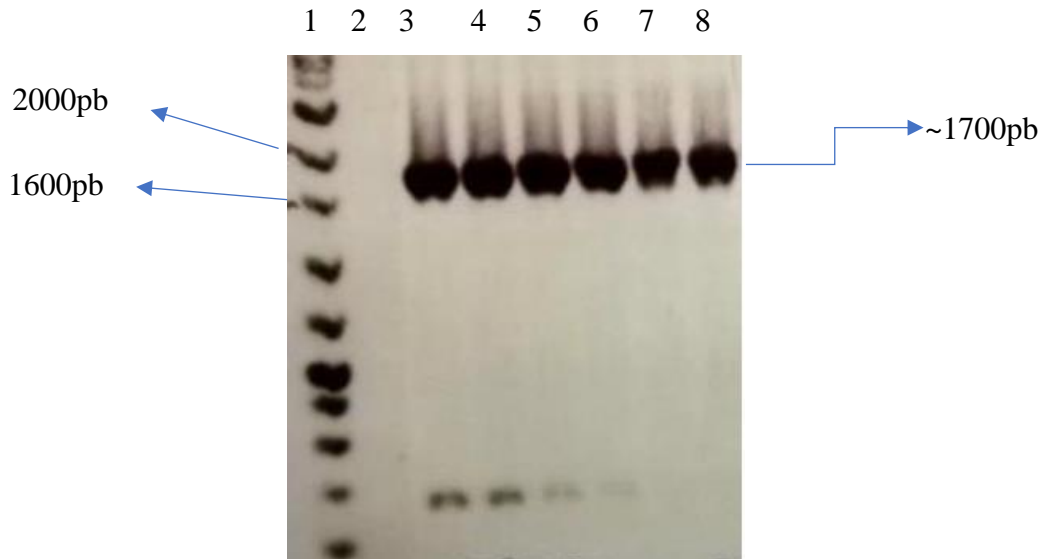


Figura 10 Confirmação da Presença de hasA2 em pHIPZ18 por PCR. 1 corresponde ao marcador molecular 1kbplus, em 2 é apresentado o controle negativo da reação, de 3 à 8 são observadas as amostras em amplificação por PCR da amostra com plasmídeo pHIPZ18+hasA2. A banda inespecífica abaixo corresponde a um gradiente de temperatura para ajuste da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

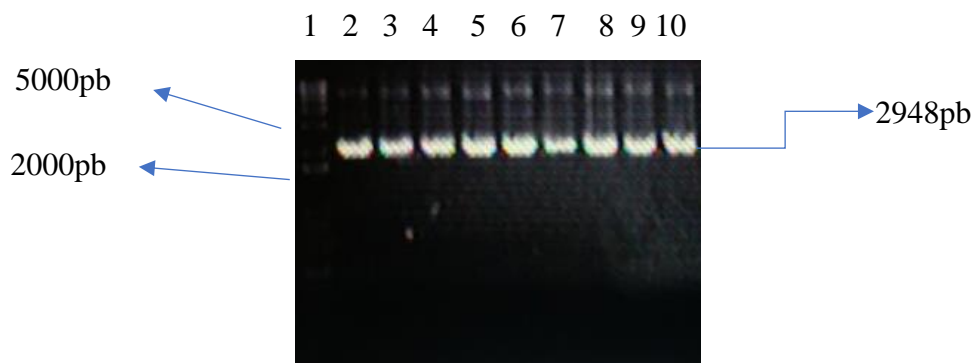


Figura 11 Confirmação da Presença de hasAP em pHIPZ18 por PCR. 1 corresponde ao marcador molecular 1kbplus, em 2 à 10 são observadas as amostras em amplificação por PCR da amostra com plasmídeo pHIPZ18+hasAP.

5.1.2 Introdução de hasB e hasC aos plasmídeos pHIPZ18+hasA2 e pHIPZ18+hasAP

Os cassetes para expressão dos intermediários da síntese AH bem como a construção do vetor foram obtidos para os genes hasB e hasC, digestão e purificação confirmando a inserção no plasmídeo pHIPZ18 contendo a isoformas de hasA2 e hasAP Figura 12.

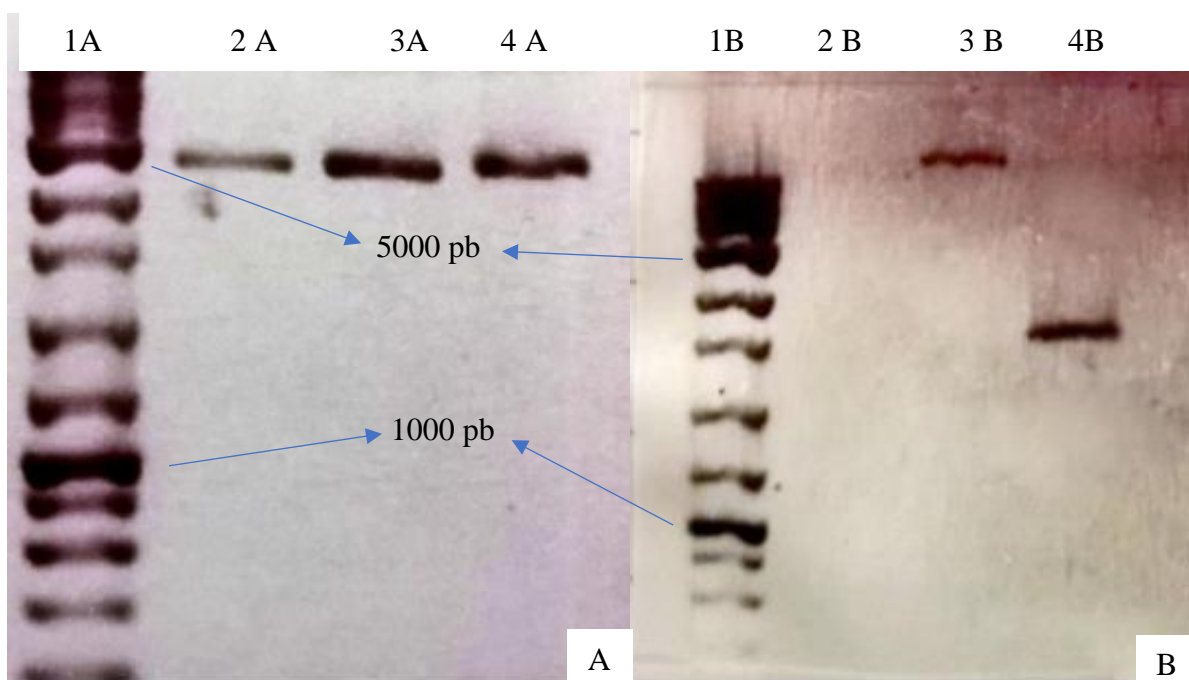


Figura 12 A confirmação da presença de hasB em 2A controle positivo, 3A pHIPZ18+ hasA2 e 4A pHIPZ18 + hasAP em montagem com o cassete com promotor GPD, confirmação por PCR. Em B confirmação da presença do cassete contendo hasC (poço 4B). 1A e 1B correspondem ao marcador 1kb plus. 2B é o controle negativo e 3B corresponde ao plasmídeo Intacto.

Vigetti et al. caracterizaram o gene hasB de *Xenopus laevis* com o intuito de observar o seu papel na síntese de ácido hialurônico, e concluíram que o gene está relacionado à síntese e afeta a produção de glicosaminoglicanos pelas células (VIGETTI et al., 2006). Uma vez que hasC seria utilizado como superexpressão de uma informação já presente na *O. polymorpha* o trabalho foi direcionado para a inserção do hasB nos plasmídeos pHIPZ18+hasA2 e pHIPZ18+hasAP. O resultado corresponde a formação da construção pHIPZ18+hasA2+hasB (Figura 8).

Não foi possível a montagem do plasmídeo com a construção do gene hasC para expressão. No caso desta construção, as células de *Escherichia coli* são usadas como uma fábrica de cópias deste plasmídeo, mas apesar das cepas utilizadas (XL10-Gold) serem

descritas como ultracompetentes para transformação de grandes moléculas de DNA com alta eficiência, foi observado uma instabilidade estrutural dos plasmídeos recombinantes.

Estudos também demonstram a importância de *hasC* para o aumento na produção de ácido hialurônico, pois a síntese deste composto depende da inserção do gene UDP-glucose pirofosforilase, o que causa um equilíbrio na concentração dos dois substratos (PRASAD; JAYARAMAN; RAMACHANDRAN, 2010). Experimentos fermentativos usando glicose como substrato, mostraram que as células expressando apenas *hasA* e *hasB* obtiveram uma máxima produção de ácido hialurônico de 0,097 g/L, enquanto que células co-expressando *hasA*, *hasB* e *hasC* obtiveram como máxima produção 0,234 g/L, aproximadamente 2,5 vezes a produção com a construção *hasA* e *hasB*. Assim sendo, o aumento na produção de ácido hialurônico depende da inserção do gene *hasC*, o que causa um equilíbrio na concentração dos dois substratos.

O presente trabalho não apenas utiliza o gene *hasC* nas construções, como o coloca sob controle de um forte promotor de modo a afetar a produção dos substratos na célula de levedura. No entanto, devido a dificuldade de construção do plasmídeo com as três construções, *hasA*, *hasB*, e *hasC*, sob controle de seus respectivos promotores, foram feitas adequações na tecnologia, onde foram obtidas cepas estáveis apenas com as construções de *hasA* e *hasB*.

5.2 Transformação dos plasmídeos finais em *O. polymorpha*.

Após a transformação em *O. polymorpha* da construção pHIPZ18+*hasA2*+*hasB* (Figura 13A) e pHIPZ18+*hasAP*+*hasB* (Figura 13B) cerca de 650 clones foram analisados. A marca de seleção por zeocina estava presente na levedura indicando a integração do plasmídeo. A presença de *hasA2* e *hasAP* foi confirmada por PCR em diversas cepas, entretanto as PCR para *hasB* não foram positivas em um primeiro momento.

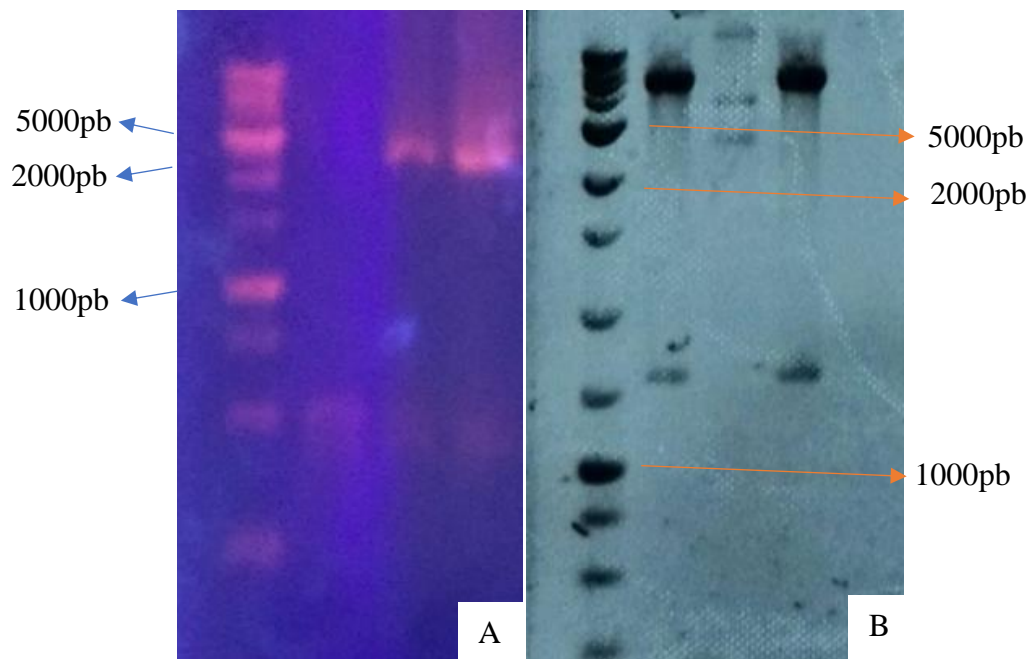


Figura 13 Em **A** Confirmação da presença de *hasA2* e *hasAP* na levedura *O. polymorpha*. Em **B** um dos muitos géis com clones que apresentaram amplificação aberrante, não confirmando a presença de *hasB*.

Após diversas tentativas de transformação foram obtidas cepas com resultados positivos para a presença de *hasB* (Figura 14).

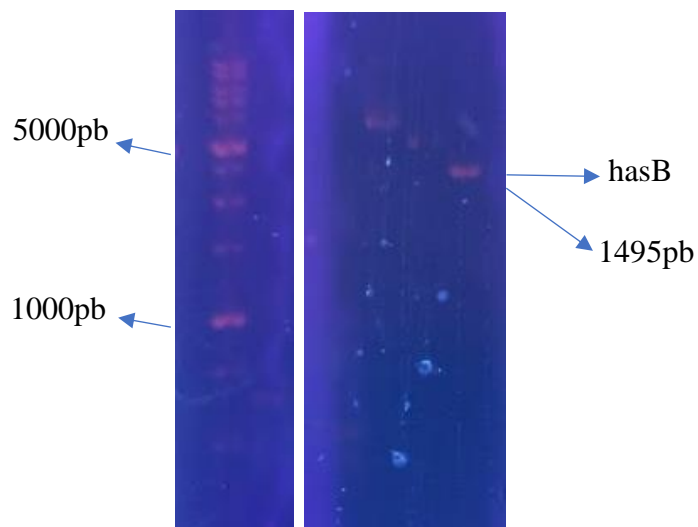


Figura 14 Imagem do Gel de agaros da PCR de colônia, confirmando da presença de *hasB*.

A construção de linhagens à partir de *O. polymorpha* configuram um desafio, uma vez que mecanismos de recombinação e reparo da levedura levam a uma instabilidade de construções, necessitando de repetições e triagem de colônias para confirmação de atividade de produção e ácido hialurônico.

5.3 Construção de pKlac2 com hasB

A Construção de pKlac 2 resultou na construção apresentada na Figura 15. Um plasmídeo construído contendo o gene *hasB* sob controle do promotor GPD.

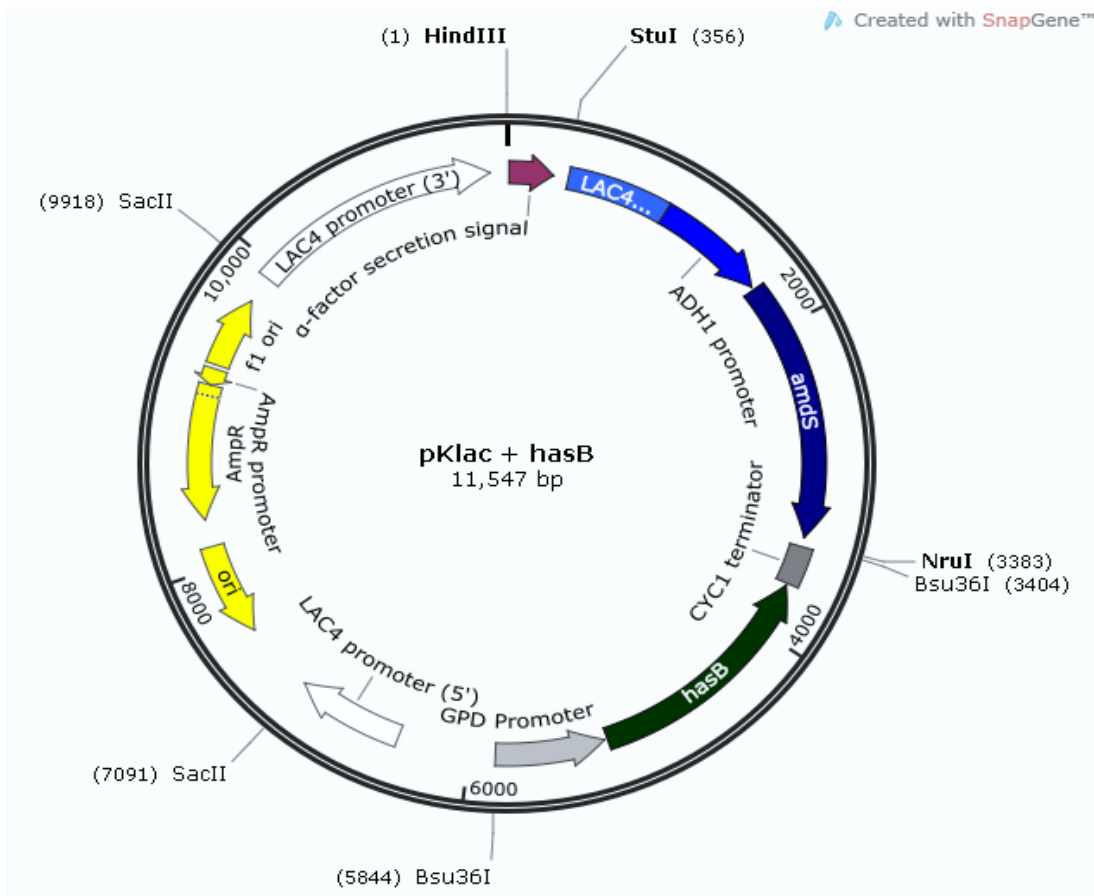


Figura 15 Esquema do plasmídeo contendo a construção pKlac2+hasB

A levedura *Kluyveromyces lactis*, assim como quase todas as leveduras, não é capaz de produzir ácido hialurônico em suas estirpes selvagens, embora possua um dos dois precursores necessários para a síntese presente em seu metabolismo, a N-acetilglicosamina.

A construção de pKlac2 com hasB serve como base para a construção de cepas de *K. lactis* produtora de ácido hialurônico. Entretanto, estudos demonstram o uso de ácido glicurônico como precursor de ácido idurônico (LINDAHL et al., 1972), um composto precursor de heparina e heparana (LI, 2010), produtos anticoagulantes e anti-inflamatórios, que atualmente são retirados, assim como o ácido hialurônico, de fontes animais.

O uso destas linhagens abre novas possibilidades de construções de heparina e sulfato de heparana, hoje obtidas de animais, além de possibilitar uma maior bio-similaridade quando comparado aos produtos disponíveis no mercado para uso humano, com menor risco de resíduos de tecidos animais, tanto de origem bovina quanto suína. Os compostos de origem animal são relatados como causadores de sangramentos e discrasias sanguíneas, devido ao tamanho da molécula obtida (AQUINO et al., 2010).

Capítulo 2

Este capítulo tem como base as publicações desenvolvidas em parcerias com outros grupos de pesquisa realizadas durante meu doutorado. As minhas contribuições para cada publicação estão descritas abaixo.

1. Parachin, N. S. ; MAGALHAES, B. S. ; Almeida, P.B.A. ; **CARVALHO, L. S.** ; Hipólito, V. . Levedura Recombinante Associada A Transportadores De Lactato Para Produção De Ácido Lático Utilizando Glicerol Bruto Como Fonte De Carbono.. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201500745, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 02/04/2015 (Anexo 4)

2. DE LIMA, POLLYNE BORBOREMA ALMEIDA; MULDER, KELLY CRISTINA LEITE; MELO, NADIELE TAMIRES MOREIRA; **CARVALHO, LUCAS SILVA**; MENINO, GISELE SOARES; MULINARI, EDUARDO ; DE CASTRO, VIRGILIO H. ; DOS REIS, THAILA F. ; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE ; MAGALHÃES, BEATRIZ SIMAS ; PARACHIN, NÁDIA SKORUPA . Novel homologous lactate transporter improves l-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. Microbial Cell Factories, v. 15, p. 158, 2016. (Anexo 5)

Contribuições: Em ambas publicações contribuí na construção das cepas de *K. pastoris* com os transportadores Jen1p e PAS. Fiz os ensaios iniciais com lactato marcado com C14.

1. Introdução

1.1. *Pichia (Komagataella) pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* é um organismo metilotrófico. Foi reclassificada no ano de 2009 passando a fazer parte do gênero *Komagataella*. Após a reclassificação *P. pastoris* foi dividida em três espécies: *K. pastoris*, *K. phaffii* e *K. pseudopastoris* (KURTZMAN, 2009).

De forma semelhante à levedura *O. polymorpha*, a levedura *Komagataella pastoris* possui elevada capacidade de secreção, tornando-se uma plataforma de expressão heteróloga com muitas aplicações, desde a produção de anticorpos monoclonais, até mesmo a produção de ácido hialurônico (JEONG; SHIM; KIM, 2014a; POTGIETER et al., 2009). O destaque dessa levedura está na sua capacidade de crescer a densidades celulares extremamente altas e alta capacidade de produção de proteínas heterólogas (HEYLAND et al., 2010).

A *Komagataella pastoris* vem sendo utilizada como hospedeira para modificações genéticas desde 1985 quando modificada o gene codificador da enzima histidinol desidrogenase foi deletado gerando uma cepa auxotrófica *his-* (CREGG et al., 1985). *K. pastoris* é atinge elevada biomassa em diferentes fontes de carbono, como glicose, glicerol, metanol e álcoois de açúcar. Sendo hoje um dos principais hospedeiros para a produção heteróloga de proteínas recombinantes. Além disso, a ausência de hiperglicosilação e a estabilidade após modificações genéticas reforçam as qualidades desta levedura para aplicações industriais.

1.2. Ácido Lático

O ácido lático (ácido 2-hidroxiopropiônico) é um composto produzido por diversos organismos como resultado da redução do piruvato para a regeneração de NAD^+ à partir de NADH (Figura 16). A redução do lactato por esta via é promovida pela lactato-desidrogenase durante a fermentação homolática.

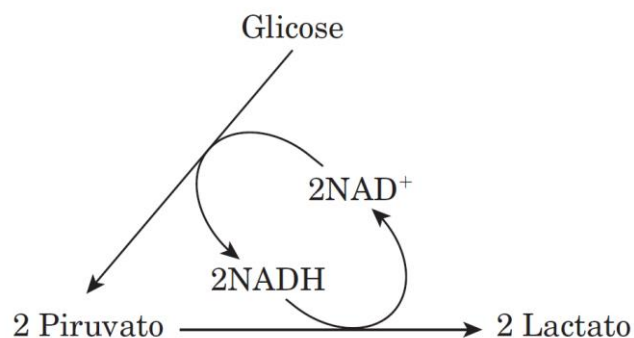


Figura 16 Representação da via metabólica natural para a produção de Lactato.

A produção industrial de ácido lático é promovida, principalmente, por bactérias lácticas através de dois padrões fermentativos, homo fermentativo que origina um único produto de fermentação (lactato) e hetero fermentativo, com a produção concomitante, principalmente de etanol e CO₂. Normalmente bactérias lácteas produzem ambos os isômeros do ácido lático. (HITCHENER; EGAN; ROGERS, 1982). Uma consequência dessas reações é a dificuldade em separar os compostos através de técnicas tradicionais (cromatografia, destilação e cristalização fracionada). Assim, é necessário selecionar técnicas de separação apropriadas ao usar substâncias com atividade ótica. Com isso é vantajosa a utilização de organismos capazes de produzir apenas um dos isômeros ópticos.

O ácido lático está entre os bioprodutos mais antigos em produção industrial e com maior volume de síntese, com um volume anual de produção mundial na ordem dos 540.000 toneladas (CHOZHAVENDHAN *et al.*, 2018; MILLER *et al.*, 2011).

1.3. Poli-ácido-lático

Atualmente a produção de bioplástico é de aproximadamente 2,05 milhões de toneladas, sendo que o Poli-ácido-lático (PLA) corresponde a 10,3% desse total (BIOPLASTICS, 2018), uma fração quando comparado ao total de plástico fóssil produzido no planeta, por volta de 348 milhões de toneladas (“• Global plastic production | Statista”, 2018).

O PLA é um poliéster alifático biodegradável, resistente, com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, feito de unidades de ácido lático (JAMSHIDIAN *et al.*,

2010). O PLA é resistente a variações de temperatura, assim, é capaz de ser moldado em uma estrutura resistente. Devido a essas características, pode substituir polímeros tradicionais de origem fóssil na moldagem de diversos tipos de produto, com destaque para próteses ortopédicas, materiais cirúrgicos absorvíveis, filmes plásticos e embalagens (KARAN et al., 2019).

A pureza óptica do ácido láctico é muito importante e, portanto, é de grande preocupação para a produção de PLA. O método por síntese química utiliza recursos petroquímicos para sintetizar ácido láctico, produzindo uma mistura racêmica de D e L ácido láctico, enquanto o método de fermentação produz apenas uma forma opticamente pura de D ou L ácido láctico (RIAZ et al., 2018).

1.4. Engenharia Metabólica de Microrganismos para a produção de L-Ácido Láctico

A produção de ácido láctico a nível industrial é prioritariamente dependente de bactérias lácticas (JAMSHIDIAN et al., 2010). Entretanto, novas tecnologias de produção vêm sendo desenvolvidas por meio de modificação genética de leveduras, pois são mais resistentes às condições industriais como oscilação de pH e temperatura, além de terem capacidade de utilização de fontes de carbono de baixo custo (RIAZ et al., 2018).

Leveduras modificadas para a produção de ácido láctico são uma alternativa viável tanto à síntese química quanto ao uso de bactérias lácticas. A vantagem no desenvolvimento de novas cepas de levedura está na possibilidade de obtenção de estereoisômeros puros e no incremento de produtividade (RIAZ et al., 2018), mesmo sendo um desafio para novas estratégias de engenharia metabólica.

Novas abordagens e estratégias ainda podem ser definidas para o desenvolvimento de cepas de leveduras que venham a apresentar elevado rendimento, como por exemplo a utilização de meios definidos de baixo custo e a construção de leveduras capazes de transportar L-ácido láctico com mais eficiência (Figura 17) (LIMA et al., 2016). Para tanto, destaca-se a utilização de *Komagataella pastoris* para o desenvolvimento de uma tecnologia que supere as demandas industriais de alta produtividade e baixo custo de produção (LIMA et al., 2016).

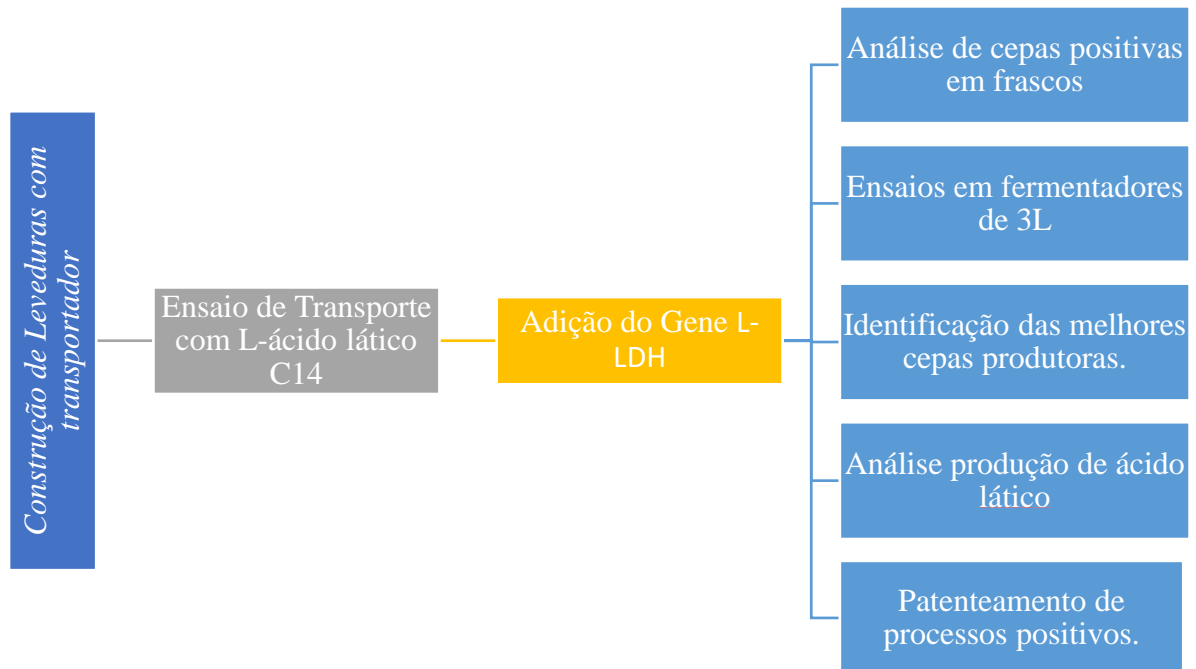


Figura 17 – Estratégia para obtenção de leveduras com maior capacidade de transporte de ácido láctico para o meio extracelular. A detecção do nível de transporte pode ser feita por cintilografia o que permite a detecção de lactato marcado com Carbono radioativo (C14). L-LDH corresponde a inserção do Gene de lactato desidrogenase na cepa que superexpressa um gene condificador para um transportador de ácido láctico.

Estudos vêm demonstrando o aumento de produtividade de L-ácido láctico ao super expressar transportadores de ácido láctico, com destaque para os transportadores JEN1P de *Sacharomyces cerevisiae* (MCDERMOTT; ROSEN; LIU, 2010) e PAS de *Komagataella pastoris* (LIMA *et al.*, 2016). Ambos contribuem com um incremento de transporte do lactato e podem ser uma alternativa para aumento de produtividade em leveduras geneticamente modificadas.

2. Objetivo Geral

Construir cepas recombinantes de *Komagataella pastoris* que super expressam o gene transportador de lactato PAS, visando a construção de uma plataforma de produção de ácido L-lático a partir de glicerol bruto.

3. Objetivos Específicos

- Construção de plasmídeo contendo o gene do transportador de lactato PAS de *K. pastoris*.
- Construção de cepas recombinantes de *K. pastoris* para superexpressão de transportador de ácido lático PAS.

4. Material e Métodos

4.1. Preparação de cepas para expressão de genes transportadores de Lactato

Em um primeiro momento foi feita uma busca na literatura por genes de transportadores de lactato. Com isso, foi observado que havia trabalhos demonstrando a expressão do transportador de lactato Jen1p de *S. cerevisiae* em vesículas de membrana de *K. pastoris* heterólogas reconstituídas, com o transportador lactato Jen1p funcional. Foi feita uma busca pela sequência desse transportador, e em posse dessas informações, foram feitas análises de homologia utilizando sequências genômicas de Jen1P de *S. cerevisiae*, utilizando <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> com o objetivo de identificar genes ortólogos. O gene PAS apresentou homologia com transportador Jen1P, com similaridade significativa (50,19% de identidade).

4.2. Extração de DNA

Para a obtenção do gene foi colocado em crescimento cepas de leveduras *K. pastoris* da linhagem X33 por 16 horas a 28 °C com objetivo de obter massa celular para extração de DNA. Para a extração de DNA foi preparado um pré-inóculo com uma colônia inoculada em 10mL de meio de cultura YPD em um tubo de fundo cônico de 15mL, que ficou sob agitação 200 RPM a 30 °C por 12hs. Após o crescimento do pré inóculo foi transferido 1mL do pré-inóculo para 40mL de meio de cultura YPD em Erlenmeyers de 250mL, que foi mantido em agitação constante de 200 RPM a 30°C por 8 horas. O meio de cultura foi transferido para tubos de fundo cônico de 50 mL, centrifugados a 6.100 G por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi colocado em suspensão com 2mL de tampão STES* Gelado. Foram feitas alíquotas de 1mL em tubos de 2mL. Adicionou-se 50 µL de *glass beads* e acrescido mais 50 µL de água miliQ; Foi colocado 500 µL de fenol:clorofórmio [1:1] e agitou-se no agitador vortex por 1min. Centrifugou-se os tubos em velocidade máxima por 5min em temperatura ambiente. Foi feita a coleta da fase aquosa superior e transferida para um novo tubo. Adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100%, sendo incubado a temperatura ambiente por 5 min e então centrifugado a 16.000 G por 15 min a 4 °C. O pellet foi lavado uma vez com etanol 70% foi para secagem no *speed vacuum* por 10 min foi ressuspensão em 200µL de TE. O DNA genômico foi armazenado a 4 °C até utilização.

4.3. Amplificação por PCR do gene PAS.

Compiladas as informações genômicas da levedura *K. pastoris*, foram construídos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene PAS nessa levedura.

O transportador PAS foi amplificado usando a reação em cadeia de polimerase PCR, tendo DNA genômico de *K. pastoris* como molde e os oligonucleotídeos iniciadores PAS_R (5' ATCGAATTCTTACTTATTTTCCTTCAAAGC 3') e PAS_F (5' TTCGCGGCCGCATGTCGCATTCAATCC3'), sintetizados pela IDT DNA. A temperatura de anelamento dos *oligonucleotídeo iniciadors* foi de 51°C seguindo o protocolo de PCR.

Após amplificação, a PCR foi purificada pelo Kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN®). A purificação do produto de PCR foi analisada em gel de agarose 0,8%.

4.4. Ligação de fragmentos de DNA (vetor-inserto)

A ligação foi feita de acordo com o protocolo de ligação do fabricante da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®), mantida a 16 °C por 16 horas. Após este período, foi colocada no freezer -12 °C até a transformação em *E. coli*.

4.5. Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação (MgCl₂) (Adaptado de SAMBROOK et al., 1989).

Foi preparado um pré inóculo com *E. coli* DH5α em 5 mL de meio LB líquido, sob agitação de 200 RPM em agitador orbital de frascos a 37 °C por 16 horas. Foi adicionado MgCl₂ a 500 mL de meio SOB e 1 mL do pré-inóculo aos 500 mL desse meio, mantida a agitação e temperatura . A densidade ótica foi aferida com espectrofotômetro a 600nm de comprimento de onda (OD600) até atingir a densidade de 0,5. A cultura foi colocada em gelo por 30 minutos para cessar o crescimento celular, e logo após as células foram coletadas por centrifugação a 6,100 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi

descartado e as células ressuspensas em 500 mL de glicerol 10% gelado, para retirada de todo o resíduo do meio SOB. Os frascos foram centrifugados a 6,100 x g por 20 minutos a 4 °C e, novamente as células foram ressuspensas em 30 mL de glicerol gelado para cada 500 mL de inóculo inicial. Após centrifugação a 6,100 x g por 20 minutos a 4 °C, as células foram ressuspensas em 5 mL de glicerol 10 % gelado e foram feitas alíquotas em tubos de micro centrífuga de 1,5 mL no volume de 50 µL cada. Imediatamente após, as células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C.

4.6. Transformação de células bacterianas com pPICK-pgk+PAS

Os plasmídeos construídos com pPICK-pgk+PAS foram replicados em células de *E. coli* após a reação de ligação dos insertos com vetores. Foram utilizados 100 µL de células ultra competentes de *E. coli* cepa DH5α congeladas a -80 °C em tubos de 1,5 mL, que foram descongeladas por 10 minutos em banho de gelo. Após o descongelamento, foram misturados às células 10 µL de DNA plasmidial das construções. O tubo contendo células e DNA foi incubado por 30 minutos em gelo e imediatamente incubadas em banho de água à 42 °C por 90 segundos e então recolocadas imediatamente em banho de gelo por 2 minutos. Foram adicionados 900 µL de meio SOC e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação 200 µL de células foram plaqueadas em meio SOC ágar seletivo contendo ampicilina (100 µL/mL). As placas foram colocadas invertidas em incubadora à 37 °C por 24 horas. O restante de células foi repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol até concentração final de 15% e armazenado à -80 °C indefinidamente. Todos os processos descritos foram feitos com materiais estéreis e em ambiente asséptico e estéril.

4.7. Preparo de DNA em larga escala

A partir de um pré inóculo, inoculou-se 250 ml de meio LB em um frasco Erlenmeyer de 1L contendo ampicilina com a construção descrita no item 4.6 deste estudo;. As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação (100-150rpm), onde coletou-se as células por centrifugação a 4000g por 10 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em

10 ml de STE gelado, centrifugadas mais uma vez nas mesmas condições, descartando o sobrenadante, enquanto o sedimento foi ressuspensionado em 5ml de Solução I gelada. Adicionou-se 10ml de Solução II (a ser preparada no momento de uso), misturando bem, invertendo cautelosamente o tubo, várias vezes, incubando à temperatura ambiente de 5 a 10 min. Passado o tempo, adicionou-se 7,5ml de Solução III gelada, agitou-se cautelosamente para misturar bem e incubou-se o frasco no gelo por 10min. Nesta etapa pode ser visualizado um precipitado branco floculado contendo DNA cromossomal. O frasco foi centrifugado a 12000g/15min/4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Quando o verificado que o pellet não estava firme, o sobrenadante foi filtrado em peneirinha ou gaze. Adicionou-se 1/2 volume de isopropanol, foi misturado e incubado a temperatura ambiente por 10min. Passado o tempo, foi centrifugado a 12000g/10min à temperatura ambiente, lavou-se uma vez com etanol 70% e o sedimento foi seco. O precipitado foi ressuspensionado em 500µL de TE e adicionar RNase [20µg/ml] (*DNase FREE*). A solução foi transferida para um tubo Eppendorff e incubado à temperatura ambiente por 30min. Foi feita uma limpeza da solução uma vez em fenol, 1 vez com clorofane e uma vez com clorofil, reservando reservar o sobrenadante a cada etapa para uso na seguinte, o volume de cada reagente desta etapa é de 0,7 V da amostra. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo Eppendorff, onde foi adicionado 100µL de acetato de amônio 10-7,5M. Adicionou-se 2 volumes de etanol 100% e o tubo foi incubado por 30 min à temperatura ambiente, posteriormente centrifugado a 12000 g/10min/4°C. Foi removido o sobrenadante o máximo possível, lavado o sedimento por duas vezes com etanol 70%, seco e dissolvido em 50µl de H₂O MiliQ®.

4.8. Protocolo para ensaio de transportador utilizando lactato marcado com C14 (Adaptado de PAIVA; KRUCKEBERG; CASAL, 2002)

Foi feito o crescimento das cepas GS115 e GS115+PAS até o início da fase exponencial em YNB com 10g/L de glicose; centrifugou-se as células a 1400 G, adicionando posteriormente 25mL de água destilada gelada (3°C); as etapas 2 e 3 são repetidas 3 vezes; centrifugou-se as células a 1400 G, para precipitação do conteúdo celular; as células foram ressuspensionadas em 300mL de YNB com adição de 0,5% (p.V) de lactato; incubou-se por 4h a 30°C sob agitação de 150-200g; após incubação, foi repetido as etapas

2 e 3 por mais 3 vezes; centrifugou-se as células a 1400 G, para precipitação do conteúdo celular; as células foram ressuspensas em 1mL de Solução I (KH_2PO_4 [0,1M] pH 5,0) o objetivo nesta etapa é ter a maior concentração de células possível. Sempre que ressuspensado o conteúdo foi passado para o outro tubo Eppendorf, para que no final todo o conteúdo de células seja consolidado em apenas um tubo. Foram preparados tubos de fundo cônico de 15mL com 1mL de células, e adicionada a Solução I nas proporções descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Proporções de volume de preparo celular e solução 1 para ensaio de lactato marcado com carbono radioativo.

Volume de células	Solução 1
10 μL	30 μL
20 μL	20 μL
40 μL	0 μL

Após as etapas descritas anteriormente, as células foram mantidas em temperatura ambiente, e em seguida colocadas em tubos de fundo cônico de 15mL que podem ser utilizados em agitador vortex para manter a suspensão durante a aplicação nos tubos com lactato; as reações no final foram compostas de 40uL de célula (nas diferentes diluições) adicionado de 10uL de solução com lactato marcado (1uL do lactato marcado com C^{14} + 9uL do lactato não marcado em diferentes diluições) totalizando 50uL final; o lactato não marcado foi preparado em concentrações de modo que ficasse nas concentrações de 0mM, 1mM e 4mM; foi feito mix para cada uma dessas diluições de lactato marcado e com lactato não marcado e distribuído em tubos Eppendorff de 1,5mL com 10 uL da solução cada; foram preparados os tubos de cintilação com cada um contendo 3mL de líquido de cintilação. Cada um destes tubos recebeu no final uma membrana de cada internalização que durou 10s. A Figura 18 descreve as etapas do experimento de transporte.

Após preparação do ensaio, o filtro contendo as células do ensaio da Figura 18 foram colocados em tubos de cintilação, contendo o líquido de cintilação apresentando as proporções descritas na Tabela 5. Posteriormente o material foi colocado em Cintilógrafo para acompanhar a taxa de adsorção.

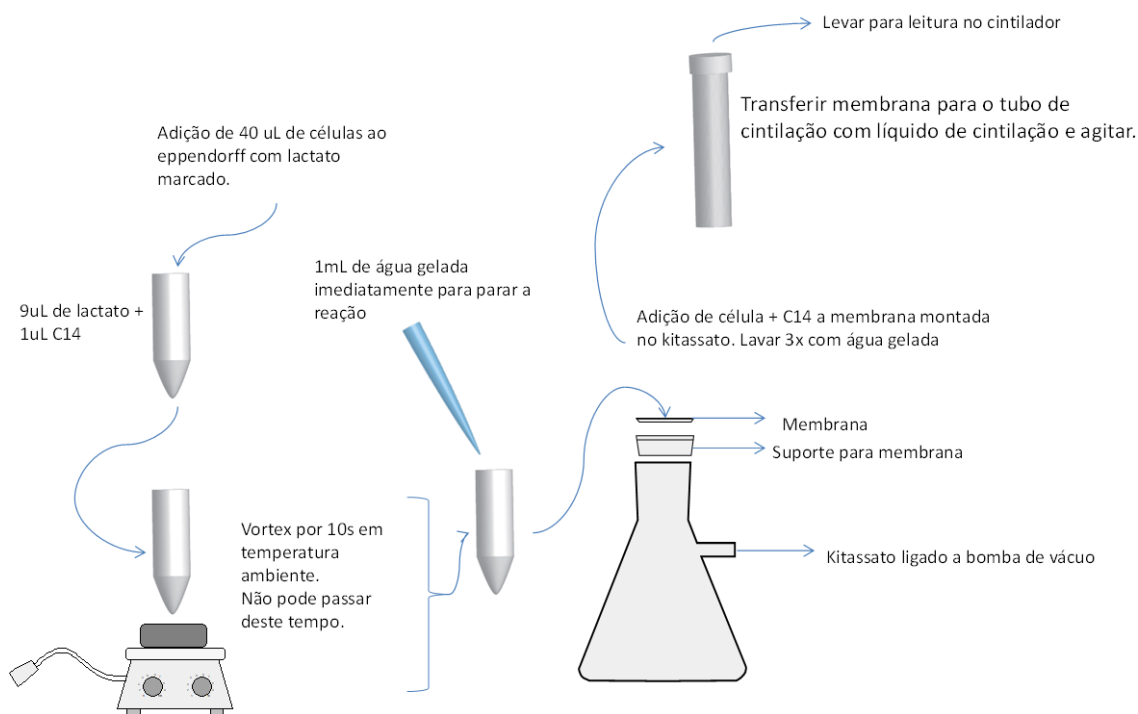


Figura 18 – Esquema do ensaio com lactato marcado com carbono radioativo C14.

Tabela 5 – Disposição dos tubos para ensaios no cintilógrafo.

TUBOS	CONCENTRAÇÃO DE LACTATO FRIO	DILUIÇÃO DE CÉLULAS µL CÉLULA: µL SOLUÇÃO 1
1;2;3	0mM	10:30
4;5;6	1mM	10:30
7;8;9	4mM	10:30
10;11;12	0mM	20:20
13;14;15	1mM	20:20
16;17;18	4mM	20:20
19;20;21	0mM	40:00
22;23;24	1mM	40:00
25;26;27	4mM	40:00
28;29²	apenas 1µL de lactato c14	(controle)

² Tubos 28 e 29 correspondem ao controle, onde indicarão a concentração máxima de lactato pode ser lido pelo equipamento.

4.9. Transformação em *K. pastoris* (SCORER et al., 1994),

Cepas de GS115 foram colocadas em 5 mL de YPD, contido em um Erlenmayer de 125 mL, durante 16 horas a 30°C. Inoculou-se 0,1 a 0,5 mL do preinóculo em 50 mL de meio YPD. Foi colocado em crescimento até uma OD₆₀₀ de 1,3-1,5. Centrifugou-se as células a 1500 G por 5 minutos (correspondente a 5000 rpm) a 4 °C e ressuspendeu-se as células em 50mL de água miliQ gelada estéril. Centrifugou-se as células a 1500 G por 5 minutos (5000rpm) a 4 °C, que foram ressuspendidas em 25 mL de água gelada. Centrifugou-se como na etapa anterior e ressuspendeu-se em 2 mL de sorbitol 1M a 4 °C estéril. Foi misturado 80 µL de células competentes com 5 a 10ug de DNA, adicionou-se 320 µL de sorbitol 1M e transferiu-se as células para uma cubeta de eletroporação de 0,2cm. Foi feita incubação por 5min em gelo e posteriormente a eletroporação com os seguintes parâmetros: 1500 V; 400 Ω e 25 µF. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado à cubeta e a suspensão foi transferida para um tubo de micro centrífuga estéril de 1,5 mL. As células foram incubadas a 30° C por 2 horas para recuperação. As cepas transformadas de GS115 foram plaqueadas em YNB (sem aminoácidos) com glicose 2% e incubadas nas mesmas condições.

5. Resultados e Discussão

Estudos com *K. pastoris* para produção de ácido lático sempre visaram a superexpressão do gene lactato desidrogenase (SAITOH et al., 2005) e deleção de genes de piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (TOKUHIRO; ISHIDA; NAGAMORI, 2009), obtendo, níveis de produtividade acima de 1g/L/h. Para desenvolver um processo de menor custo e maior produtividade, a levedura do gênero *Komagataella*, conhecida pela capacidade de utilizar uma fonte de carbono barata, o glicerol, apresenta como uma de suas principais características os altos níveis de crescimento celular (130g/L) e de expressão de genes recombinantes (BAUMANN et al., 2011). O transportador PAS foi clonado em pPIC-PGK, com a presença do gene PAS confirmada por PCR, como visto na Figura 19.

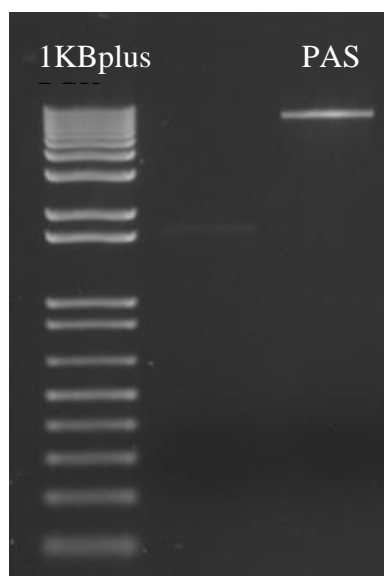


Figura 19 - Confirmação da presença do transportador PAS o gel corresponde a uma eluição da banda para confirmação por sequenciamento.

Os protocolos de manipulação da levedura já se encontram bem definidos (MACAULEY-PATRICK et al., 2005), o que facilitou o processo de transformação das leveduras. De posse das leveduras transformadas e modificadas os ensaios de transporte foram definidos

Os resultados dos ensaios de adsorção são apresentados na Figura 20. O ensaio com lactato marcado radioativamente se mostrou uma ferramenta eficiente para obtenção das informações relativas à capacidade de transporte das cepas modificadas.

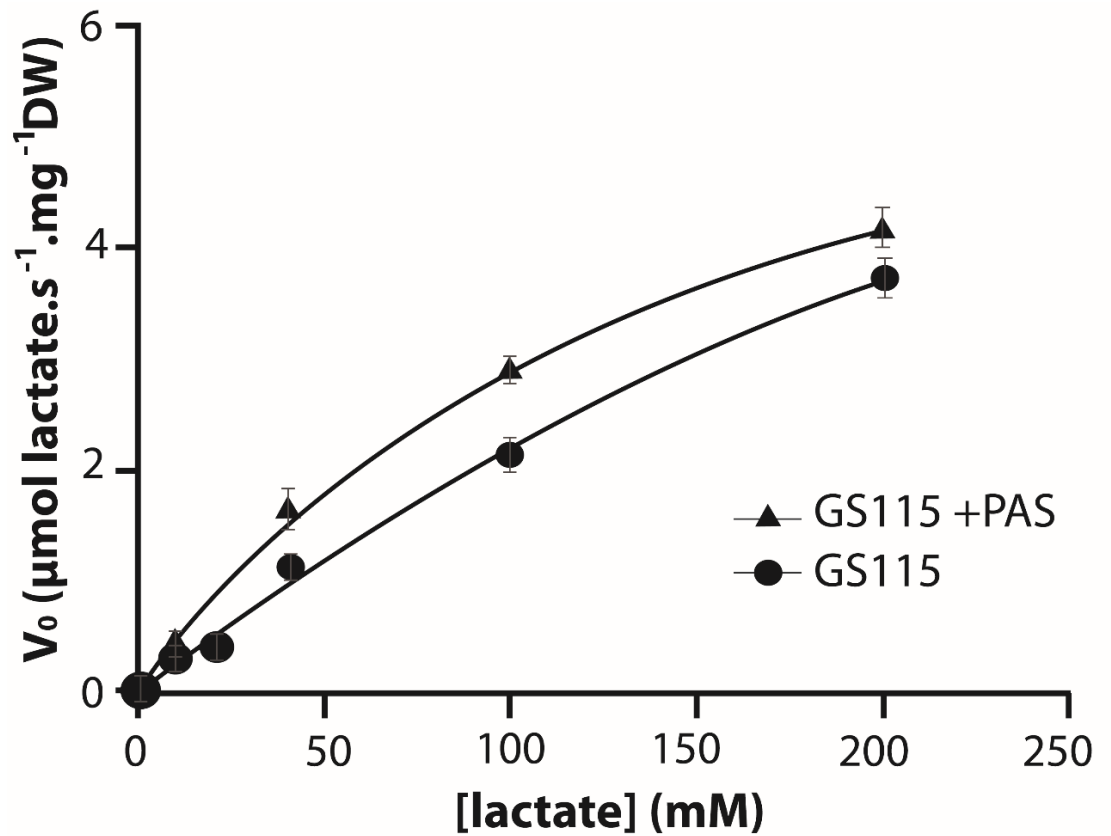


Figura 20 - Gráfico do ensaio de transporte com o transportador PAS demonstrando um aumento de transporte de L-ácido láctico. O ensaio realizado com lactato marcado e detecção por cintilografia. A normalização foi feita pelo cálculo de peso seco (DW).

6. Referências Bibliográficas

- Global plastic production | Statista.** Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- ALMQUIST, Joachim et al. Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. **Metabolic engineering**, p. 1–22, 15 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747045>>. Acesso em: 28 abr. 2014.
- AQUINO, Rafael et al. Heparins from porcine and bovine intestinal mucosa: Are they similar drugs? **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 05, p. 1005–1015, 22 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH09-11-0761>>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- BAILEY, J E. Toward a science of metabolic engineering. **Science (New York, N.Y.)**, v. 252, n. 5013, p. 1668–75, 21 jun. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2047876>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- BAUMANN, Kristin et al. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris* - a comparative analysis. p. 7–9, 2011.
- BERARDI, E.; THOMAS, D. Y. An effective transformation method for *Hansenula polymorpha*. **Current Genetics**, v. 18, n. 2, p. 169–170, ago. 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00312606>>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- BIOPLASTICS, European. **Global production capacities of bioplastics 2017-2022**. . [S.l.: s.n.], [s.d.]. Disponível em: <www.european-bioplastics.org>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- BONGAERTS, Johannes et al. Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds. **Metabolic Engineering**, v. 3, n. 4, p. 289–300, 1 out. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109671760190196X>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- BORBOREMA ALMEIDA DE LIMA, Pollyne et al. Novel homologous lactate transporter improves l-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 158, 2016. Disponível em:

- <www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>. Acesso em: 22 jan. 2019.
- CÉSAR, Júlio et al. Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. p. 1–13, 2013.
- CHOZHAVENDHAN, S. et al. Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Industry for the Production of Value-Added Bioproducts. [S.l.]: Springer, Singapore, 2018. p. 65–82. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7431-8_4>. Acesso em: 26 fev. 2019.
- CREGG, J M et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 12, p. 3376–85, 1 dez. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3915774>>. Acesso em: 7 fev. 2019.
- DE OLIVEIRA, Juliana Davies et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 119, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0517-4>>. Acesso em: 4 fev. 2019.
- DEANGELIS, P. L. Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from *Pasteurella multocida*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8454–8458, 3 abr. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.14.8454>>. Acesso em: 26 nov. 2013.
- DEANGELIS, Paul L. CARBOHYDRATES , LIPIDS , AND OTHER NATURAL PRODUCTS : Molecular Directionality of Polysaccharide Polymerization by the *Pasteurella multocida* Hyaluronan Synthase Molecular Directionality of Polysaccharide Polymerization by the *Pasteurella multocida* Hyaluro. 1999.
- DENG, M D; COLEMAN, J R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 2, p. 523–8, 1 fev. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925577>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- DOBSON, Rosemary; GRAY, Vincent; RUMBOLD, Karl. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. p. 217–226, 2012.
- GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied**

- microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 741–50, dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152064>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- GELLISSEN, Gerd. *Hansenula polymorpha: Biology and Applications*. [S.l.: s.n.], 2002.
- HEYLAND, Jan et al. Quantitative Physiology of *Pichia pastoris* During Glucose-Limited High-Cell Density Fed-Batch Cultivation for Recombinant Protein Production. v. 107, n. 2, p. 357–368, 2010.
- HITCHENER, Beverley J.; EGAN, A.F.; ROGERS, P.J. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, n. 1, p. 31–37, 1 fev. 1982. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04369.x>>. Acesso em: 4 fev. 2019.
- HONG, Won-Kyung et al. Enhanced production of ethanol from glycerol by engineered *Hansenula polymorpha* expressing pyruvate decarboxylase and aldehyde dehydrogenase genes from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1077–1082, 31 ago. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10529-010-0259-z>>. Acesso em: 26 set. 2019.
- ISHCHUK, Olena P. et al. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 911–919, 1 dez. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22457>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- JAMSHIDIAN, Majid et al. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 552–571, 26 ago. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x>>. Acesso em: 18 fev. 2019.
- JEONG, Euijoon; SHIM, Woo Yong; KIM, Jung Hoe. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. v. 185, p. 28–36, 2014a.
- _____. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 28–36, 20 set. 2014b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165614002648?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

- KARAN, Hakan et al. Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. **Trends in Plant Science**, v. xx, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>>.
- KATA, Iwona et al. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADHI* activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. **Yeast**, v. 33, n. 8, p. 471–478, 1 ago. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.3175>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- KEASLING, Jay D. Manufacturing molecules through metabolic engineering. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1355–1358, 2010.
- KHOSLA, Chaitan; KEASLING, Jay D. Metabolic engineering for drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 1019–1025, 1 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd1256>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- KURTZMAN, Cletus Paul. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella pha Y i* as determined from multigene. p. 1435–1438, 2009.
- KURYLENKO, Olena O et al. Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 122, 20 dez. 2014. Disponível em: <<http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-014-0122-3>>. Acesso em: 26 set. 2019.
- KUSAKABE, Tamami et al. Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. **Metabolic Engineering**, v. 20, p. 101–108, 1 nov. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717613000918>>. Acesso em: 4 ago. 2019.
- LAURENT, TORVARD C.; FRASER, J. R. Hyaluronan. **The FASEB Journal**, v. 6, n. 7, p. 2397–2404, 1992.
- LEAO, A; KIEL, J. Peroxisome homeostasis in. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 2, p. 131–139, 1 nov. 2003. Disponível em: <[https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/S1567-1356\(03\)00070-9](https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/S1567-1356(03)00070-9)>. Acesso em: 18 ago. 2019.

- LEE, Sang Yup et al. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1–2, p. 78–88, 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135964460800281X>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- LI, Jin-ping. Glucuronyl C5-Epimerase: An Enzyme Converting Glucuronic Acid to Iduronic Acid in Heparan Sulfate/Heparin Biosynthesis. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 93, p. 59–78, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117310930044>>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- LINDAHL, Ulf et al. Biosynthesis of L-iduronic acid in heparin: Epimerization of D-glucuronic acid on the polymer level. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 46, n. 2, p. 985–991, 31 jan. 1972. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X72802389>>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- LÖBS, Ann-Kathrin; SCHWARTZ, Cory; WHEELDON, Ian. Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 198–207, set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29318200>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- MACAULEY-PATRICK, Sue et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. p. 249–270, 2005.
- MANFRÃO-NETTO, João Heitor Colombelli; GOMES, Antônio Milton Vieira; PARACHIN, Nádia Skorupa. Advances in Using *Hansenula polymorpha* as Chassis for Recombinant Protein Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 94, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2019.00094/full>>. Acesso em: 18 ago. 2019.
- MCDERMOTT, Joseph R; ROSEN, Barry P; LIU, Zijuan. Jen1p : A High Affinity Selenite Transporter in Yeast. v. 21, p. 3934–3941, 2010.
- MILLER, C. et al. Industrial Production of Lactic Acid. **Comprehensive Biotechnology, Second Edition**, v. 3, n. January 2016, p. 179–188, 2011.
- OSTERGAARD, S; OLSSON, L; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces*

- cerevisiae. **Microbiology and Molecular ...**, v. 64, n. 1, p. 34–50, 2000. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101808>%5Cn<http://mibr.asm.org/content/64/1/34>.short>.
- PAIVA, Sandra; KRUCKEBERG, Arthur L; CASAL, Margarida. Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical journal**, v. 363, n. Pt 3, p. 737–44, 1 maio 2002. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964174>>. Acesso em: 5 ago. 2019.
- PALMER, W; JOHN, Karl Meyer. The polysaccharide of the vitreous humor. **J. Biol. Chem.**, v. 107, p. 629–634, 1934.
- POTGIETER, Thomas I. et al. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 4, p. 318–325, 2009.
- PRASAD, Shashi Bala; JAYARAMAN, Guhan; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 273–283, 28 mar. 2010. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2293-0>>. Acesso em: 4 fev. 2019.
- RIAZ, Sundus et al. Metabolic Engineered Biocatalyst: A Solution for PLA Based Problems. **International journal of biomaterials**, v. 2018, p. 1963024, 2018. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30302092>>. Acesso em: 18 fev. 2019.
- RYABOVA, Olena B et al. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 2, p. 157–64, nov. 2003. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613880>>. Acesso em: 5 jul. 2016.
- SAITOH, Satoshi et al. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2789–92, 1 maio 2005. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870375>>. Acesso em: 22 jan. 2019.
- SAQIB, Shaima et al. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 79, maio 2017. Disponível em:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28500401>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- SPOHNER, Sebastian C. et al. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 104–116, 20 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912289>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- THANH, Le Tu. Catalytic Technologies for Biodiesel Fuel Production and Utilization of Glycerol: A Review. p. 191–222, 2012.
- TOKUHIRO, Kenro; ISHIDA, Nobuhiro; NAGAMORI, Eiji. Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. p. 883–890, 2009.
- VAN OOYEN, Albert J.J. et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 3, p. 381–392, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630278>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- VIGETTI, Davide et al. Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 12, p. 8254–63, 24 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418163>>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- WEIGEL, Paul H; HASCALL, Vincent C; TAMMI, Markku. Hyaluronan Synthases *. p. 13997–14000, 1997.
- YU, Huimin; STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. v. 10, p. 24–32, 2008.

7. Anexos

7.1 Anexo 1 – Relatório Descritivo de Patente (BR10201602019)

LEVEDURA RECOMBINANTE DA ESPÉCIE *Hansenula polymorpha* PARA A PRODUÇÃO DE GRANDES CADEIAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção se situa no campo técnico da biotecnologia. Trata-se do desenvolvimento de linhagens recombinantes da levedura *Hansenula polymorpha* para a superprodução de ácido hialurônico, um biopolímero de elevado valor agregado formado pelo ácido glicurônico e a N-acetilglicosamina, a partir de sacarose ou glicerol como fonte de carbono. Esse composto forma um fluido que apresenta propriedades reológicas como viscosidade e elasticidade, que se deve às características físico-químicas das cadeias poliméricas que o constituem, conferindo características de fluido não newtoniano. É naturalmente encontrado no líquido sinovial, humor vítreo e no tecido conjuntivo de diversos organismos, e é uma importante glicosaminoglicana (GAG) com função fundamental para a manutenção das articulações, podendo, dessa forma, ter aplicações médico-farmacêutica e cosmética.

7.2 Anexo 2 – Relatório Descritivo de Patente (BR10201602018)

Levedura recombinante da espécie *Kluyveromyces lactis* para a produção de grandes cadeias de ácido hialurônico

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO


[001] A presente invenção trata da construção de uma levedura recombinante através do uso de técnicas de engenharia genética, que pertence ao campo da Biotecnologia pela utilização de um processo biológico na solução de problemas técnicos. Mais precisamente, refere-se à construção de uma cepa recombinante da levedura *Kluyveromyces lactis* para a produção do polímero de alto valor e peso molecular e largamente utilizado na indústria médico-farmacêutica, o ácido hialurônico.

REVIEW

Open Access



Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms

Juliana Davies de Oliveira¹, Lucas Silva Carvalho², Antônio Milton Vieira Gomes³, Lúcio Rezende Queiroz³, Beatriz Simas Magalhães^{1,2} and Nádia Skorupa Parachin^{3*} 

Abstract

Hyaluronic acid, or HA, is a rigid and linear biopolymer belonging to the class of the glycosaminoglycans, and composed of repeating units of the monosaccharides glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine. HA has multiple important functions in the human body, due to its properties such as bio-compatibility, lubricity and hydrophilicity, it is widely applied in the biomedical, food, health and cosmetic fields. The growing interest in this molecule has motivated the discovery of new ways of obtaining it. Traditionally, HA has been extracted from rooster comb-like animal tissues. However, due to legislation laws HA is now being produced by bacterial fermentation using *Streptococcus zooepidemicus*, a natural producer of HA, despite it being a pathogenic microorganism. With the expansion of new genetic engineering technologies, the use of organisms that are non-natural producers of HA has also made it possible to obtain such a polymer. Most of the published reviews have focused on HA formulation and its effects on different body tissues, whereas very few of them describe the microbial basis of HA production. Therefore, for the first time this review has compiled the molecular and genetic bases for natural HA production in microorganisms together with the main strategies employed for heterologous production of HA.

Keywords: Hyaluronic acid, Hyaluron synthase, *Streptococcus zooepidemicus*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*

Background

Hyaluronic acid, also called hyaluronan or hyaluronate (HA), is considered an important glycosaminoglycan due to its varied physiological functions. This polymer is composed of disaccharide repetitions of glucuronic acid (UDP-GlcUA) and *N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), linked by $\beta 1 \rightarrow 3$ and $\beta 1 \rightarrow 4$ glycosidic bonds (Fig. 1) [1, 2]. In contrast to other glycosaminoglycans, HA is the only non-sulphated polymer, which allows the molecule to be rigid and straight [1]. It is produced in the plasma membrane of all mammalian cells, amphibians and bacteria [3] by integral membrane enzymes called hyaluronic

acid synthases (HAS), which have several isoforms according to its producing organism.

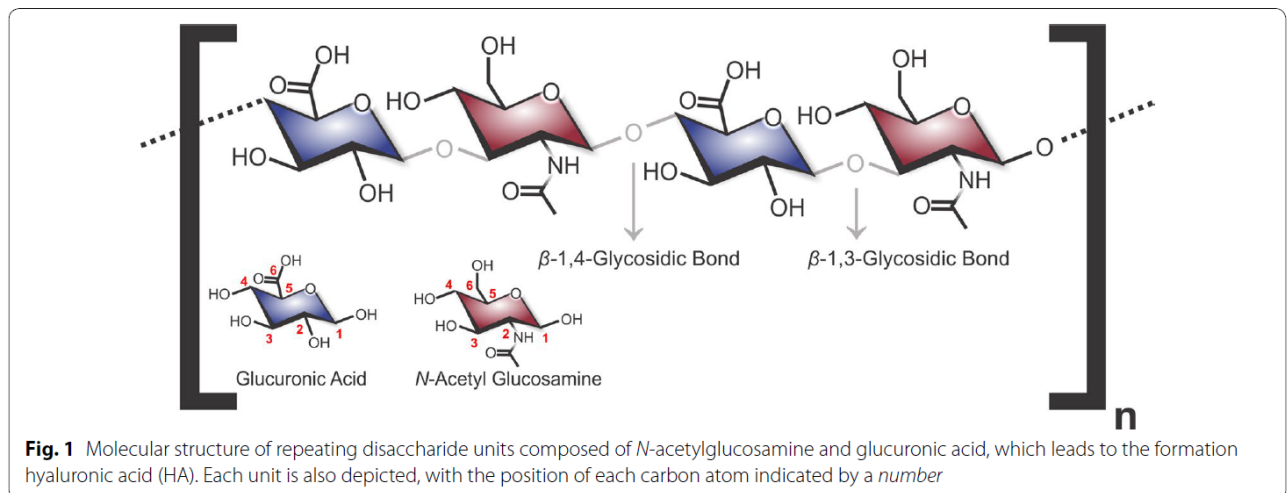
In humans, HA is present in all organs and especially abundant in connective tissue [4]. HA reaches higher concentrations in the cartilage tissue in the vitreous humor [5], the synovial fluid of the joints [6] and in the umbilical cord [7] and is responsible for the maintenance of tissue homeostasis [8]. This polymer is directly involved in processes such as embryogenesis [9], inflammation [10], metastasis or tumor progression phenomenon [11], angiogenesis [12] and the healing process [13]. Another common feature of HA in eukaryotic organisms is that it confers a smooth aspect to the skin. It has been reported that with aging, HA production decreases, which results in the dehydration and loss of elasticity of the skin, contributing to the appearance of wrinkles [14].

*Correspondence: nadiasp@gmail.com

³ Grupo de Engenharia Metabólica Aplicada a Bioprocessos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP 70.790-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article





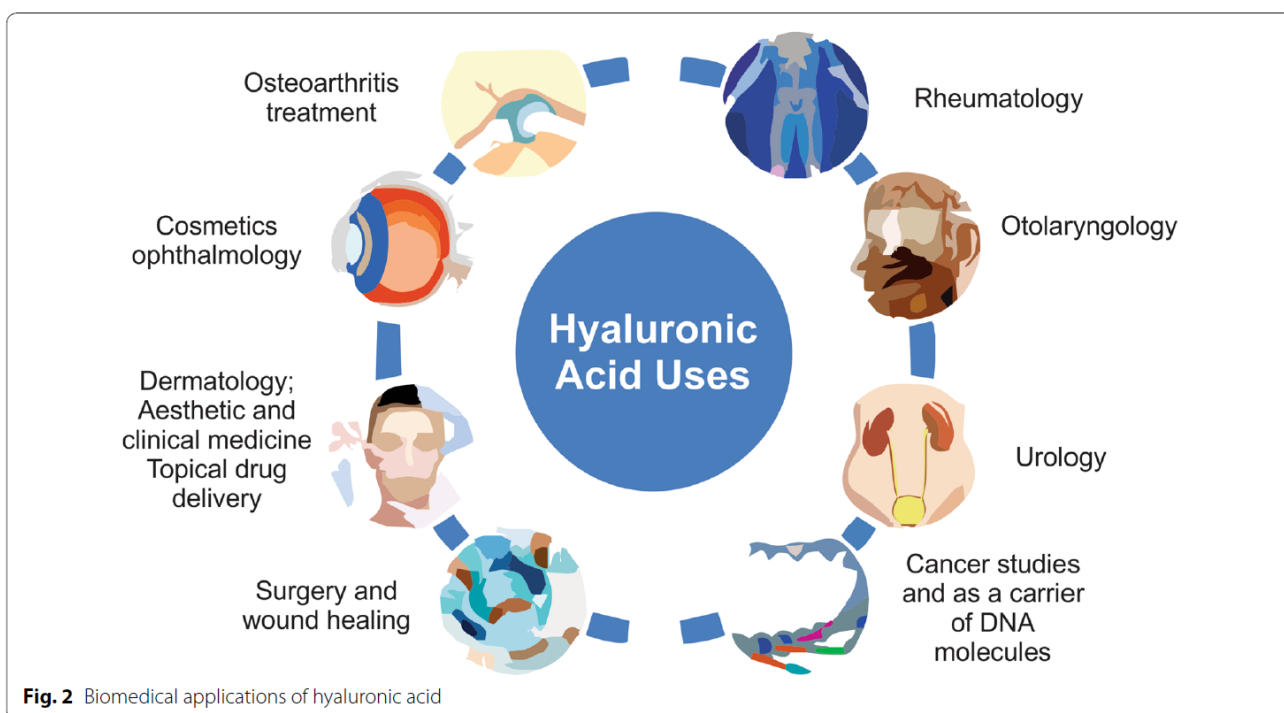
The main characteristics of HA that makes it a very attractive molecule are: (1) high hygroscopicity; (2) viscoelastic nature; (3) high biocompatibility; (4) non-immunogenicity and (5) it does not generate toxic products when degraded. The use of HA has seen results in ophthalmic cosmetics [15], in surgery [16], as a drug delivery system [17], in rheumatology [18], in otolaryngology [19] and in urology [20]. The many applications of hyaluronic acid are illustrated in Fig. 2. However, of all the previously mentioned applications, the use of HA is more frequent in the field of dermatology as dermal filler for the treatment of wrinkles. Lastly, in tissue engineering, HA is used as a mechanically and physically appropriate support for tissue that can be implanted in organisms without causing allergic reactions or immune responses [21].

Together with the increased number of applications of hyaluronic acid, the market share tends to grow over the years. Currently, this polymer is valued at USD 1000–5000/kg depending on its purity and size [22]. According to a search conducted in 2014 by the intelligence company firm “Transparency Market Research”, the marketing value of the HA in 2012 was USD 5.32 billion and should reach USD 9.85 billion by 2019. Initially, its commercialization was done exclusively by extraction from animal tissues in the early 1940s [23]. Nevertheless, the disadvantages of this methodology include the loss of HA by degradation caused by the activity of the endogenous hyaluronidase enzyme, harsh extraction conditions and high purification costs, since animal-derived HA could contain contaminants such as viruses [23]. Therefore, alternative routes for HA production have been developed. To date, commercial hyaluronic acid is mainly obtained by the market through microbial fermentation. The use of HA from microorganisms is feasible since it is

non-immunogenic and therefore biocompatible due to its highly-conserved structure among different species [24].

In the early 80s, HA started to be produced using the bacteria *Streptococci* as a host cell. However, the genus *Streptococci* is known to possess several human pathogens, thus, the HA purification costs using this bacteria genus are elevated. Therefore, other microorganisms, natural producers or genetically engineered ones, have been considered for HA production. Ideally, a perfect microorganism for HA production should have GRAS status (generally regarded as safe), not secrete any toxins and be able to produce the biopolymer continuously so it can reach at least 1 megadalton (MDa). The molecular weight (MW) and the purity of HA are indicative of its quality: polymers that have a greater MW (>0.5 MDa) have greater market value. From the microbial point of view, producing such a polymer is also a challenge because of its high metabolic energy cost. For instance, in order to produce a dimer of HA, three ATP molecules, two UTP molecules, two NAD⁺ molecules, one molecule of Acetyl-CoA and one molecule of glutamine (counting the energy expended towards glycolysis) are necessary for the synthesis of the two precursors of HA (Fig. 3).

The increased interest in HA production is reflected by the increased number of publications and patents filed over the last years. A search performed in databases has shown that 2220 articles and patents were published between 2005 and 2010. This number increased about 2.5 times in the period from 2011 to 2015. Considering the constant and increased interest in HA qualities, this review is aimed at summarizing the basis of HA production in naturally producing organisms and in engineered strains for hyper production. Most published reviews have focused on HA formulation and its effects in different body tissues, whereas very few of them describe the



microbial basis of HA production [25–28]. Therefore, this review has compiled the genetic and molecular bases used by the microorganisms that are currently known to produce hyaluronic acid together with the main strategies employed for heterologous production of HA.

Main text

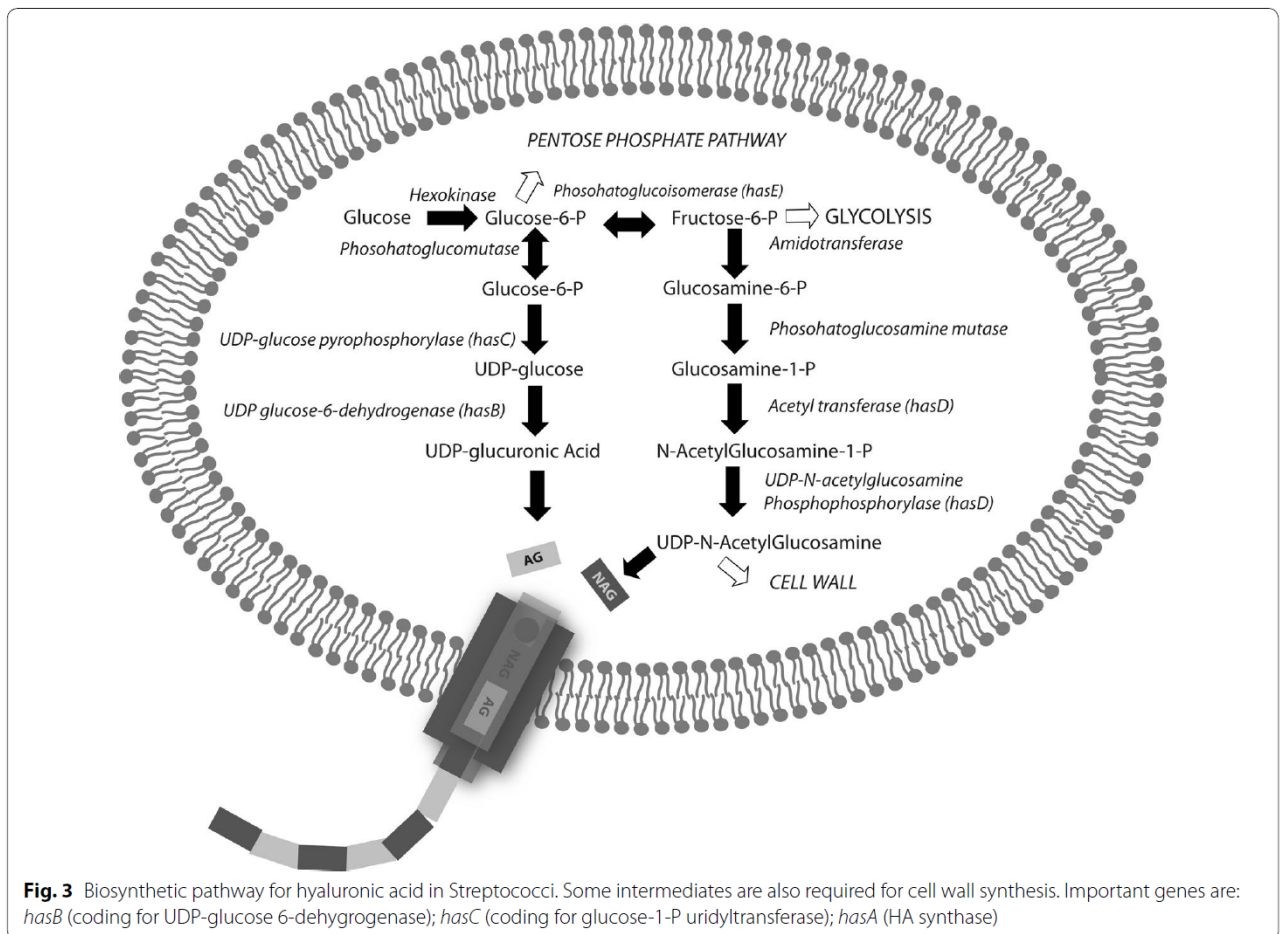
Basis of HA synthesis: HA-synthases

The synthesis of a HA chain in all natural producers initially emerge from the glycolytic pathway. The two precursors, UDP-GlcUA and UDP-GlcNAc are synthesized, respectively, from deviations of the molecules glucose-6-phosphate and fructose 6-phosphate from glycolysis (Fig. 3), in a process that occurs entirely on the inner side the plasma membrane in the cytoplasm. Furthermore, from the deviation of the glycolytic pathway to the production HA there is also the production of molecules used by cells as wall polysaccharide synthesis, synthesis of teichoic acids and peptidoglycan (Fig. 3) which corresponds to 20 % of dry weight of a regular cell [25]. In other words, the biomass formation competes with precursors to the synthesis of hyaluronic acid [29]. Once available in the cell, UDP-GlcUA and UDP-GlcNAc are used as substrates by hyaluronan synthase enzyme (HAS), an enzyme that have transmembrane domains and catalyze the union of the two sugar precursors intracellularly to finally release the chain in the extracellular matrix (Fig. 3) [30]. This process is advantageous to the cell since it allows the synthesis of unrestricted size

chains, and prevent the waste energy cell for a possible subsequent transport chains out of the cell [31].

Although the elongation of hyaluronic acid chain through the plasma membrane is simple, HAS enzyme is an multidomain enzyme with six different binding sites: (1) a UDP-GlcNAc binding site and (2) a UDP-GlcUA binding site, both for the capture of their precursors, (3) a domain GlcNAc β (1–4) transferase and (4) a domain UDP-GlcUA β (1–3) transferase which bind the precursors to each other and (5) an HA acceptor site which receives the newly formed chain and (6) excretes the molecule out of the cell [31].

A recent review detailed the main metabolic controlling factors of hyaluronan synthases [32]. HA is a glycosaminoglycan (GAG) synthesized outside the golgi, unlike other GAGs, and therefore dependent of the pool of precursors contained in the cytoplasm. Thus, the hyaluronic acid production is affected when both sugar nucleotide precursors are in low concentrations. On the other hand, an increase in the amount of precursors does not significantly affect the production of GAGs in the golgi, but affects the production of HA [32]. The majority of GAGs (which are sulfated) are synthesized in the golgi while the HA is synthesized at the plasma membrane, however, the affinity of the sugar nucleotides receptors located in the membrane of the golgi is very high. This feature makes the amount of sugars into the golgi is high all the time, unlike the amount of the cytoplasm [33, 34].



The UDP-GlcNAc is also an cell wall precursor and used by the cell in various other functions, coming to have a molar concentration equivalent to the molar ATP concentration [35, 36]. Thus, it is not unusual to observe that the amount of the UDP-GlcNAc inside the cell drastically affects the production of HA, even more than UDP-GlcUA. Previous studies have suggested that high concentrations of ATP and/or low concentrations of UDP-GlcNAc force the HAS enzyme to cleave the chain and release the polymer into the extracellular matrix [37]. Moreover, the proper balance in the synthesis of UDP-GlcNAc/UDP-GlcUA and the balance of the glycolytic rate and HA synthesis rate are also important factors for obtaining high molecular weight HA [38].

Not only the enzymes that produce directly both precursors affect the HA production, but also other enzymes, like UDP-glucose pyrophosphorylase, which converts glucose-1-phosphate to UDP-glucose is critical for the HA synthesis. The UDP-glucose is also a metabolite used in the reversible synthesis of glycogen, which can affect the energetic state of the cell to produce HA [39].

In metabolic terms, the demand for ATP, UTP and acetyl-CoA (Fig. 3) by the cell require an energy expenditure that is not always available and drastically affects the production of HA. Furthermore, the synthesis of 1 mol of UDP-GlcUA produces two moles of NADH, forcing the cell to find ways to recycle NAD⁺. In other words, a high rate NADH: NAD⁺ also inhibits HA production.

HASs are divided into two categories, designated Class I and Class II, based on their amino acid sequence homology and structural topology [30, 40]. HA synthases belonging to Class I are present in some species of *Streptococcus*, viruses and vertebrates. Whereas, Class II HAS had so far only been described in *Pasteurella multocida* [30]. The latter differs from Class I HAS in terms of protein conformation and its relationship with the coupling of the plasma membrane, also affecting the mechanism of action of HA synthesis. Class I enzymes contain multiple transmembrane domains, while Class II HAS is coupled to the plasma membrane through a single domain near the carboxyl terminus by an undescribed mechanism [30]. Another main difference between the two classes of enzymes is the form of HA production, the enzymes of

Class I add the two sugar precursors (UDP-GlcUA and UDP-GlcNAc) at the reducing end and the enzymes of the Class II extend the polysaccharide chain at the non-reducing end. Table 1 summarizes the main characteristics of HA synthases from Classes I and II.

The eukaryotic Class I HA synthases show homology to Class I HA synthases from microorganisms, indicated by up to five conserved transmembrane domains, with a DXD motif in the cytoplasmic region of the glycosyltransferase domain (PFam: PF00535) between the second and third transmembrane, therefore responsible for the binding of UTP-sugars to the enzyme leading to the polymerization of HA. The bacterial HAS demonstrates up to 47 % similarity within 92 % of query cover; this homology is usually attributed to a lateral gene-exchange from the animal host to the bacterium that may have occurred in the past. Figure 4 shows the phylogenetic relationship between streptococcal HAS protein sequences with the most relevant vertebrate model organisms in which HAS proteins have been reported. Hyaluronic acid produced by animals and microbes are extremely different in molecular weight and rate of synthesis, wherein the speed of synthesis in microbes is ten-fold faster than the speed in animals [25, 41]. However, the great similarity between the genes involved in the production of hyaluronic acid of different cells requires a theory for the existence of this sharing. The discovery that *Chlorella* virus cells are capable of inducing the production of hyaluronic acid in host cells [42] and the discovery of a *has* gene into a *Bacillus anthracis* plasmid confirmed the theory and classification of the gene *has* as one of the 223 candidates that are capable of lateral gene transfer in bacteria to vertebrates [26], which explains the similarity existing among *has* genes. On the other hand, the Class II—HAS from *Pasteurella multocida* (pmHAS)—is different from

all other HA synthases, as previously discussed, which is likely to be an example of convergent evolution, a phenomenon in which living organisms develop similar characteristics from different sources, in this case, different enzymes with the same product: HA [43].

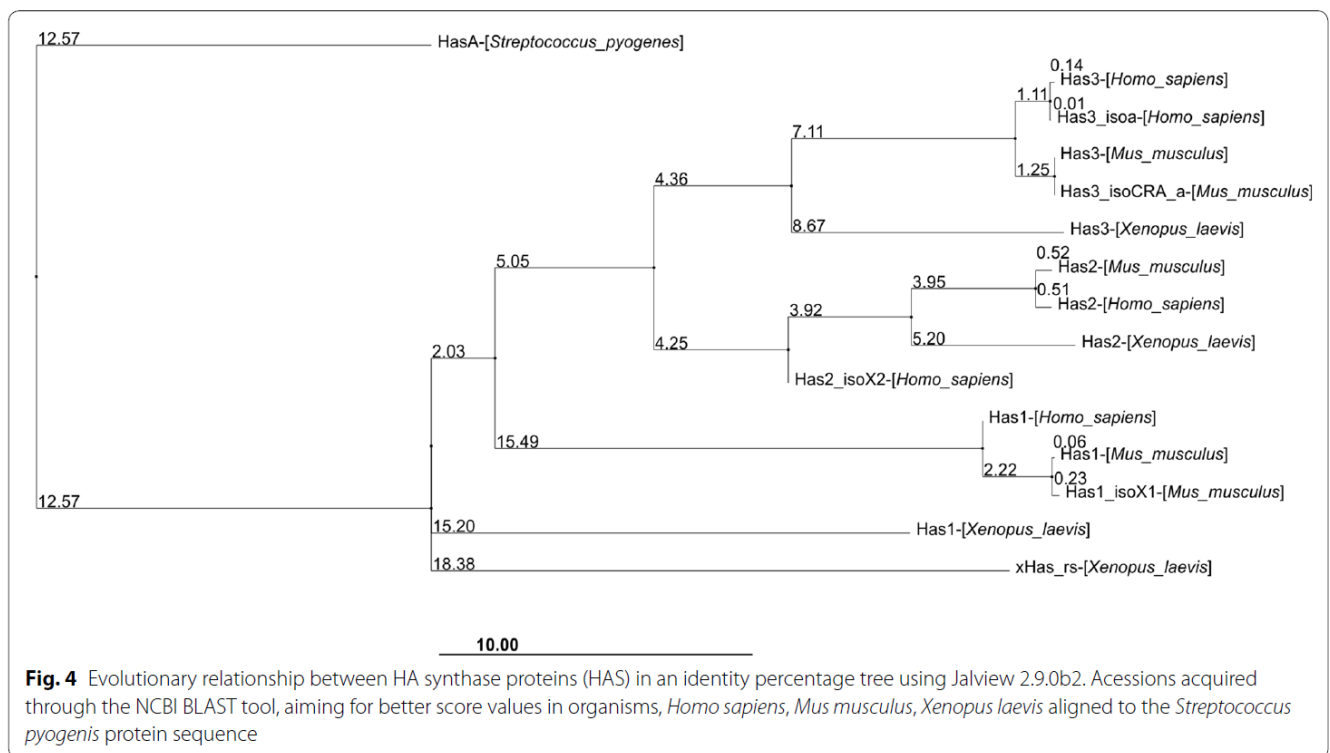
It is now acknowledged that eukaryotes feature three HAS isoforms: HAS1, HAS2, and HAS3, encoded by three related *HAS* genes on three different chromosomes [2, 40]. The single exception is the frog, *Xenopus laevis*, for which four HAS encoding genes can be observed. Additionally, *X. laevis* HA synthase was reported to synthesize HA polymers of 20 MDa in vitro [2, 44], in contrast with the Streptococcal strains that generally produce smaller MW ranges of HA (around 0.8–1.5 MDa) and 3 MDa in animal tissues [45].

All the three isoforms of HAS in eukaryotes are owned to Class I and are structurally similar in relation to domains e regions. The three isoforms possess an *N*-terminal region, a cytoplasmic central region and a *C*-terminal hydrophobic region. The central region is the most well preserved and has a high rate of similarity between the three isoforms, reaching 87 %. However, for each reported isoform of HAS in eukaryotes, the catalytic rate and mode of regulation has been shown to be different [2, 46]. Although each of the three isoforms have a highly conserved amino acid sequences, each enzyme has different kinetic properties and mechanisms of action. HAS1 is an enzyme that has a lower activity and is responsible for the maintenance of constitutive levels of HA synthesis having a MW between 0.2 and 2 MDa; HAS2 is more active compared to HAS1, and generates HA polymers with MW greater than 2 MDa. In addition, HAS2 plays an important role in damage repair suffered by the tissues when they are in development and expansion, moreover, this isoform is involved in cardiac cushion

Table 1 Main characteristic of HA synthases from Class I and II

	Class I		Class II
	Reducing	Nonreducing	
Organisms	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. equisimilis</i> , <i>S. uberis</i> , mammalian and avian	Amphibian species, algal virus	HAS of <i>Pasteurella multocida</i>
Size (amino acids)	417–588		972
Membrane attachment domain	6–8 membrane-associated domains		C-terminal membrane anchor
HA chain growth	At reducing end	At nonreducing end	At nonreducing end
Reaction type	Hexosyl group transfer		hexosyl group transfer
Metals and ions	Co ²⁺ ; KCl; Mg ²⁺ ; Mn ²⁺ ; NaCl		Co ²⁺ ; Mg ²⁺ ; Mn ²⁺ ;
K _M value [mM]	0.032–1.1		0.014–0.91
K _i value [mM]	1.2–4.5		ND
pH optimum	5–9		ND
Temperature optimum (°C)	22–60		ND

ND not determined



morphogenesis. The enzyme HAS2 is also associated with the production of HA involved in cell migration and invasion, cell proliferation, and with angiogenesis during development. Being the more active isoform, HAS3 is able to produce HA chains of various sizes (0.2–2 MDa). The longer chains participate in the formation of the pericellular glycocalyx and are responsible for interactions with the cell surface receptors, while the shorter chains participate in processes that shape the cellular activities through signal transduction cascades.

Aiming to characterize and compare the enzymatic properties of the three HAS proteins, the three responsible genes for HA synthesis in mammals have been cloned and expressed either in COS-1 cell strain or rat 3Y1 fibroblast cell strain. Kinetic studies of these enzymes have shown distinctions between their stability, HA elongation rate and apparent K_M values for the UDP-GlcNAc and UDP-GlcUA substrates. When the study compared the V_{max} of the three recombinant isoforms (HAS1, HAS2, and HAS3), the values obtained were not significantly different (ranging from 330.5 to 398.5 pmol/h/unit) considering the concentrations of UDP-GlcUA as saturating (1.0 mM), whereas the K_M value for UDP-GlcNAc of HAS1 was 1.01 mM; about three- to fourfold greater than those of HAS2 and HAS3, respectively [47]. This result strengthens the suggestion that this enzyme could be responsible for constitutive levels of HA as discussed earlier.

Microorganisms that naturally produce HA

Some bacterial pathogens such as *Pasteurella multocida* and Gram-positive *Streptococcus* Group A and C can produce and secrete HA chains [48]. The particularities of each producing pathway from natural HA producers are detailed below. It is worth noting that some eukaryotic microorganisms also have the ability to synthesize HA, such as the yeast *Cryptococcus neoformans* and the green algae *Chlorella* sp., which occurs when it is infected by the *Paramecium bursaria* chlorella virus (or Chlorovirus) (PBCV-1) [49, 50].

HA synthesis from *Cryptococcus neoformans* is catalyzed by a glycosyltransferase (CPS1 gene) [49, 50]. Despite *C. Neoformans'* ability to synthesize HA, there are no reports involving *C. neoformans* as a large scale producer of this biopolymer, possibly for being an opportunistic pathogen [50, 51].

HA synthesis by microalgal *Chlorella* cells occurs upon infection with chloroviruses [48, 52]. PBCV-1-infected chlorella was monitored for HA synthesis, and studies indicated that about 80 % produce HA during infection [53]. In general, the production (maximum of 1 g/L, JP patent 2004-283096) does not reach the values typically achieved using Streptococcal fermentation (Table 2). However, recent methods were proposed to improve the yield of HA production in *Chlorella*: (1) using isolated chlorovirus cells that have low growth rate (CV01 and CVTS1) and (2) affecting the ability of cells to reproduce

by using molecules capable of inhibit DNA synthesis inside the cell, and aphidicolin [52]. The use of the two approaches together allowed for a concentration of 14 µg/ml, about a 2.2-fold increase over PBCV-1 infected chlorella, which showed a concentration of 6.3 µg/ml HA.

Pasteurella multocida

Pasteurella multocida, a non-motile, Gram-negative coccobacillus, is a pathogen that causes pneumonia in piglets and calves [54]. Synthesis of HA in *P. multocida* is catalyzed by a polypeptide originating from a single gene (pmHAS) [30, 43]. This gene encodes for a HAS enzyme that polymerizes the HA chain, adding the sugars glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate to the non-reducing end of the growing polymer chain. This characteristic allows the enzyme pmHAS to elongate exogenous and short chains of HA to form long chains in vitro. However, in vivo, the chains cannot be elongated due to a blockage of the enzyme by the actual HA chain [30].

In order to investigate which gene was responsible for HA synthesis in this microorganism, the entire capsule locus of *P. multocida* serogroup A:1 was cloned in *E. coli* DH5α and sequenced [55]. From this study, it was shown that only pmHAS was functional. However, sequence homology has identified *hyaA* and *hyaC* as a putative glycosyltransferase and a UDP-glucose dehydrogenase, respectively [55, 56]. Despite the fact that HA is naturally produced by *P. multocida*, there are no reports employing this microorganism to super-produce HA, possibly due to the microorganism's pathogenicity or lack of genetic engineering tools. Nevertheless, it is more common to heterologously express pmHas genes for HA production in other microorganisms [57–59].

Streptococcus sp.

Streptococci are non-sporulating and non-motile Gram-positive bacteria that have the characteristic to grow surrounded by a large extracellular capsule [20]. Various wild-type strains of Streptococci are able to produce HA, such as *Streptococcus equisimilis* (an animal pathogen) [60], *S. pyogenes* (a human pathogen) [31] and *S. uberis* (a pathogen in cattle) [61]. However, among these, the species *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* are the commonly used (Table 2).

The bacteria *Streptococcus zooepidemicus* (subspecies of *Streptococcus equi*) has a operon used for HA synthesis encoded by five genes: (1) HA synthase or HasA, (2) UDP-glucose dehydrogenase or HasB, (3) UDP-glucose pyrophosphorylase or HasC, (4) UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase or *glmU* that have a activity of acetyltransferase and pyrophosphorylase, and a gene

encoding for (5) phosphoglucosomerase [62, 63]. In *S. pyogenes*, the enzymes of the biosynthetic pathway of HA are regulated by a polycistronic mRNA, in other words, a single mRNA is transcribed from more than one gene, that includes HasA, HasB and HasC (involved in UDP-glucuronic acid synthesis) [64, 65] HasB is required to make UDP-GlcUA, one of the two substrates needed for HA synthesis, which is synthesized from glucose-6-phosphate coming of a deviation from the glycolytic route (via glucose-1-phosphate). HasC is an enzyme that catalyzes the conversion of UTP-Glc-1-phosphate (glycose-1-P) to UDP-Glucose (UDP-Glc), one of the two HA precursors (Fig. 3) [66]. HasA adds in strict alternating fashion the two HA precursors (UDP-GlcNAc and UDP-GlcUA) to the non-reducing end of the growing HA chain, using the two UDP-sugar substrates, alternatively creating β1 → 3 and β1 → 4 glycosidic bonds (Fig. 1) [2].

In addition to HA synthesis, many of these intermediate molecules are used by the cells as wall components (production of peptidoglycan) and teichoic acid components [25, 56]. Cloning of the streptococcal HA synthase encoding genes in *Escherichia coli* confirms that only HasA enzyme is required for HA biosynthesis when the cell is already producing glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine [60].

Over time, a combination of strain improvement and cultivation conditions have been performed in order to enhance the HA production [67]. The mutant strain from *S. equi* ATCC 6580 was generated using sequential cultivations with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine and reached 6–7 g/L of HA in a 100 L fermentor (Table 2). In another study [63] a strain of *S. zooepidemicus* had the metabolic pathway of synthesis of HA engineered completely by an adjustment of the concentrations of the metabolites through the overexpression of the five HAS genes encoding for HA. The concentrations of the two precursors of HA within the cell affects the molecular weight of the final chains, when the genes involved in UDP-*N*-acetylglucosamine pathway are overexpressed the final HA MW increases (~3.4 MDa; double the amount found in wild-type strain), and when the genes involved in UDP-glucuronic pathway are overexpressed the final MW decreases (Table 2). On the other hand, overexpression of the enzyme that synthesizes HA (HasA) produces an increase in the HA yield [68].

The application of chemical mutagenesis followed by a serial selection program has been successfully exploited to obtain a hyaluronidase-negative, non-hemolytic, kanamycin-resistant, and highly viscous mutants strains of *S. equi* strains [67]. HA production by the *S. equi* ATCC 6580 mutant (renamed *S. equi* ATCC KFCC 10830) was tested with and without the addition of lysozyme. When lysozyme is added to the cells, the cell wall structure is

Table 2 Organisms that naturally produce HA

Microorganism	Substrate concentration (g/L)	Production (g/L)	Yield $Y_{P/S}$ (g/g)	Productivity (g/L/h)	Molecular weight (MDa)	Reference
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Glucose: 10	0.95	0.09	0.0396	NR	[63]
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24	Glucose: 15	6.6	0.071	0.33	NR	[99]
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Glucose: 10	2.45	0.12	0.223	NR	[3]
<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> (<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246)	Glucose: 20	NR	0.088	NR	2.4	[100]
<i>Streptococcus equi</i> ATCC 6580 (mutant)	Glucose: 80	5.5	NR	0.344	3.8	[57]
<i>Streptococcus equi</i> ATCC 6580 (mutant)	Glucose: 80	6–7	0.088 ^a	0.47 ^b	3.2	[57]
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> G2 (mutant)	Glucose: 40	3.51	NR	0.251	2.19	[60]
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> (overexpression of genes involved in biosynthesis of UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine)	Glucose: 20	NR	0.075	NR	~3.4	[3]
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102	Glucose: 40	6.94	NR	0.289	5.9	[101]
Chlorella cells infected with Chlorovirus	NR	0.5–1	NR	NR	NR	[27]
Chlorovirus infected with PBCV-1	NR	6.3×10^{-6}	NR	1.6×10^{-6}	NR	[41]
Chlorovirus with PBCV-1 CV01	NR	7.6×10^{-6}	NR	0.95×10^{-6}	NR	
Chlorovirus with PBCV-1 CVTS1	NR	9.2×10^{-6}	NR	1.15×10^{-6}	NR	
Chlorovirus infected with PBCV-1 (aphidicolin)	NR	$\sim 1.0 \times 10^{-5}$	NR	5.3×10^{-6}	NR	
Chlorovirus with PBCV-1 CV01 (Aphidicolin)	NR	14×10^{-5}	NR	3.5×10^{-6}	NR	
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (KCTC 11935BP)	NR	6.94	NR	0.289	5.9	[101]

NR not reported

^a Calculated from the values reported by the authors of the maximum production of HA (P) and the consumed substrate (S), defined as Yield = P/S^b Calculated from the values reported by the authors of the maximum production of HA (P) and the cultivation time to obtain this production (t), defined as productivity = P/t

disintegrated causing a stress to the culture broth during the growth, in these cases the HA production expanded of 3.65–4.63 g/L. This suggests that the HA is a cell protective agent produced by the microorganism in response to an unfavorable or critic environment [67] (Table 2).

S. zooepidemicus showed potential of HA production levels close to those obtained by means of processes that use high-value compounds used in the laboratory, while using marine industrial by-products as source of carbon and aminoacids [69]. The amount of dissolved oxygen in the culture medium also affects the production of HA, *S. zooepidemicus* ATCC 39920 was exposed to ultraviolet (UV) light and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidinea resulting in the mutant strain called G1 [70]. Under anaerobic conditions, cell growth and HA synthesis were suppressed and the HA MW was only 1.22 MDa with a final production of 0.73 g/L. On the other hand, the production of HA in an aerobic fermentation was obtained with a doubled MW, but there were no changes in biomass or HA yield (Table 2).

Microorganisms genetically modified for HA production

Metabolic engineering has been providing opportunities to obtain HA from non-pathogenic, safe microorganisms and,

hence, an endotoxin-free product since the natural producing organisms are mostly pathogenic. With these criteria, HA has already been produced by a wide range of heterologous hosts, including: *Lactococcus lactis* [71–75], *Enterococcus faecalis* [64], *Corynebacterium glutamicum* [76], *Agrobacterium* sp [58], *Escherichia coli* [43, 48, 64, 77–79], *Streptomyces albulus* [80], *Bacillus subtilis* [74, 81, 82], *Saccharomyces cerevisiae* [83], *Pichia pastoris* [45] and plant cell cultures [84, 85]. Many studies have included the evaluation of HA production using different genetic modifications, HAS proteins, and different hosts as discussed below.

Prokaryotic organism

Among the different domains, bacteria is the main exploited for heterologous production of HA. The following topics discuss some of the organisms studied so far.

Bacteria

Lactococcus lactis Gram-positive lactic acid bacterium, *L. lactis* is used worldwide as starter for the production of numerous products [86]. *L. lactis* has many desirable characteristics for a fermentative microorganism and a GRAS status, therefore many attempts has been made to genetically modify it for HA production [72].

Nevertheless, *L. lactis* does not produce the enzyme HA synthase, which has a crucial role in HA production. Therefore, initial studies on HA production using *L. lactis* utilized non-integrative plasmids such as pRKN; pNZ8148; and their derivatives, for the expression of genes encoding HAS proteins [71–73, 75]. It is noteworthy that the *L. lactis* NZ9000 strain transformed with pSJR5, co-expressing five different genes (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *hasD* and *hasE*) has exhibited structural and segregational instability, resulting in incorrect gene expression or loss of plasmid after few generations [71]. Strains successfully transformed with plasmids packed with genes *hasA-B*, *hasA-B-C*, and *hasA-B-D*, were respectively named strains SJR2, SJR3, and SJR6. Static flask experiments using glucose as a substrate indicated that the strain co-expressing the genes *hasA* and *hasB* obtained a production of 0.097 g/L HA, while the other experiment with the strain co-expressing *hasA*, *hasB* and *hasC* genes yielded a maximum production of 0.234 g/L HA, as indicated in Table 3, suggesting that the introduction of the *hasC* gene is essential for high HA production [71]. In submerged anaerobic fermentations, HA production was three times higher (0.72 g/L) using the SJR3 strain, in comparison to the SJR2 strain (0.26 g/L). Additionally, when the bioreactor containing a SJR3 culture was aerated at 1 vvm, HA production increased to 1.8 g/L. Another construct, named SJR6, was assessed for HA production and transcription of HA pathway genes, as shown in Table 3 [73].

The low levels of HA production conducted with the SJR2 strain was hypothesized to be due to low UDP-glucose pyrophosphorylase (*hasC*) levels [71]. On the other hand, the co-expression of the genes *hasC*, *hasA* and *hasB* genes (SJR3 strain), increases HA production from 0.097 to 0.234 g/L. It has been discussed that increased HA production levels are due to the increase in UDP-glucose pyrophosphorylase levels in the SJR3 strain culture, diverting the flux of glucose-1-phosphate toward UDP-glucose synthesis. Therefore, different concentrations of substrate were tested for each recombinant strain, all listed in Table 3. From these results, it is assumed that HA biosynthesis depends not only on culture conditions and on the combination of heterologous genes incorporated in the strain but also on the expression level and transcriptional regulation of the homologous genes in the host genome.

The plasmids pEIrkA, pEIrkB, and pEIrkAB containing *hasA*, *hasB*, and *hasA* together with *hasB*, respectively, all from *S. equi* subsp. *Zooepidemicus*, have been introduced into *L. lactis* [72]. The expression of each gene was studied in order to relate it to HA production levels. The strain containing only *hasA* produced 0.08 g/L, while the strain containing *hasA* together with *hasB* had

approximately an eight-fold increase in HA production, as shown in Table 3. The strain containing only *hasB* did not produce any HA [72].

Recombinant *L. lactis* strains were developed, resulting in two strains called VRJ2AB, carrying *HasA* and *HasB* genes, and VRJ3ABC, carrying *HasA*, *HasB* and *HasC* genes, integrated into their genomes [87]. HA production and MWs were, respectively, between 0.14 and 0.68 g/L and 4.3 and 3.49 MDa (Table 3). Overall, genome-integrated strains produced a two-fold increase in the HA polymer MW when compared to the plasmid-based strains. The significant difference in MW of HA derived from these strains could be explained by the precursors ratio effects (UDP-GlcNAc/UDP-GlcUA) and the *HasA/HasB* mRNA ratio. In the plasmid-bearing strains, *HasA* gene expression was high, but due to lower *HasB* expression, a sufficient substrate was not available during synthesis of HA chains by HA synthases, resulting in a relatively lower MW. In genome-integrated strains, there were relatively fewer HA synthases available and a greater availability of precursors for binding to HA synthase, facilitating greater MWs to be synthesized. In another study, it was hypothesized that the MW of HA can be regulated by *hasA/hasB* mRNA production levels. When the *hasA/hasB*-mRNA ratio was above 1.00, the HA polymer usually had a smaller size when compared to ratios below 1.00, whereby *hasB* mRNA levels are greater than *hasA* [75].

Enterococcus faecalis This bacterium is a Gram-positive cocci with a natural habitat in the oral cavity and human intestinal lumen [88]. In the literature, there are only a few studies involving *E. faecalis* and the production of HA [89]. This might be due to the low total production yield obtained when compared to other microorganisms as shown in Tables 2 and 3. De Angelis et al. reported that the introduction of locus encoding of at least two streptococcal proteins could produce HA in acapsular *E. faecalis* mutants [89]. When *HasA* was introduced in *E. faecalis*, it was able to synthesize 0.69 g/L HA using 20 g/L of glucose (Table 3).

Corynebacterium glutamicum These Gram-positive bacteria are the important microorganism with GRAS status for industrial amino acid production [90]. Nevertheless, *C. glutamicum* is also used for the biosynthesis of pantothenic acid [91], carotenoids [92], organic acids [93] and biofuels [94–96].

Therefore, for HA heterologous production, *C. glutamicum* was tested as an alternative host [76]. For that, a set of expression vectors was constructed containing *HasA*, encoding HA synthase from *S. equi* subsp. *Zooepidemicus*. To analyze the influence of precursors

Table 3 Prokaryotic microorganisms and their genetic modifications for the HA production

Microorganism	Genetic modification	Substrate concentration (g/L)	Production (g/L)	Yield $Y_{p/s}$ (g/g)	Productivity (g/L/h)	Molecular weight (MDa)	Reference
<i>Lactococcus lactis</i> BCRC 12312	Operon containing HA synthase (<i>HasA</i>) of <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Glucose: 0.1	0.08	0.8 ^a	0.0022 ^b	NR	[62]
<i>Lactococcus lactis</i> BCRC 12312	Operon containing HA synthase (<i>HasA</i>) and UDP-GlcDH (<i>HasB</i>) of <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Glucose: 0.1	0.65	6.5 ^a	0.018 ^b	NR	[62]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	Expression of HA synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Fed batch of glucose: 5 and fed batch of lactose: 20	0.12 0.59	NR NR	NR NR	0.879 0.569	[65]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR2)	has operon of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (co-expressing <i>HasA</i> and <i>HasB</i> genes only)	Glucose: 15	0.107 (in static flask experiments)	0.007 ^a	0.0178	NR	[61]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR3)	has operon of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (co-expressing <i>HasA</i> , <i>HasB</i> , and <i>HasC</i> genes)	Glucose: 25	0.068 (in static flask experiments)	0.002 ^a	0.0113	NR	
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR2)	has operon of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (co-expressing <i>HasA</i> and <i>HasC</i> genes)	Glucose: 10	0.234 (in static flask experiments)	0.023 ^a	0.039	NR	
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR3)	has operon of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (co-expressing <i>HasA</i> and <i>HasB</i> genes only)	Glucose: 25	0.154 (in static flask experiments)	0.006 ^a	0.257	NR	
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR2)	has operon of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (co-expressing <i>HasA</i> and <i>HasB</i> genes only)	Glucose: 10	0.123	0.012	0.005 ^b	NR	[63]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR3)	has operon of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (co-expressing <i>HasA</i> , <i>HasB</i> , and <i>HasC</i> genes)	Glucose: 10	0.43	0.041 ($Y_{p/s}$)	0.0179 ^b	NR	[63]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 (SJR6)	Three has operon genes (<i>HasA</i> , <i>HasB</i> and <i>glimU</i>) from <i>S. zooepidemicus</i>	Glucose: 10	0.595	0.09 g/g ($Y_{p/s}$)	0.0248 ^b	NR	
<i>L. lactis</i> NZ9000 VRJ2AB	<i>L. lactis</i> carrying <i>HasA-HasB</i> gene in <i>nisRK</i> region	Glucose: 10	0.14	0.014 ^a	0.0117	4.3	[77]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 VRJ3ABC	<i>L. lactis</i> carrying <i>HasA-HasB-HasC</i> gene in the <i>nisRK</i> region	Glucose: 10	0.68	0.068	0.0567	3.49	[77]
<i>Enterococcus faecalis</i> OGIRF	Transposon 916 insertional mutagenesis	THY broth	0.002-0.69	ND	ND	ND	[64]
	Was subcloned into a plasmid shuttle vector (pAT19 and pPD41)						

Table 3 continued

Microorganism	Genetic modification	Substrate concentration (g/L)	Production (g/L)	Yield $Y_{p/s}$ (g/g)	Productivity (g/L/h)	Molecular weight (MDa)	Reference
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH174.1	<i>HasA</i> expression	MEK700 with glucose: 40	Between 0.3 and 0.4	0.017	~0.003 ^b	>1.4	[87]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH181.3	<i>HasA</i> and <i>HasC</i> coexpression	CGXII with glucose: 40	~1.0	0.023	~0.008 ^b	<0.27	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH182.1	<i>HasA</i> and <i>vgb</i> (bacterial haemoglobin from <i>Vitreoscilla</i> sp.) coexpression	MEK700 with glucose: 40	Between 0.3 and 0.4	0.016	~0.003 ^b	>1.4	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH183.2	<i>HasA</i> , <i>HasC</i> and <i>HasB</i> coexpression	CGXII with glucose: 40	Between 1.0 and 1.3	0.025	~0.01 ^b	<0.27	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH195.2	<i>HasA</i> and <i>gimU</i> (from <i>Pseudomonas putida</i> KT2440) coexpression	MEK700 with glucose: 40	Between 0.1 and 0.2	0.075	~0.001 ^b	>1.4	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH196.2	<i>HasA</i> , <i>HasC</i> and <i>gimU</i> coexpression	CGXII with glucose: 40	~0.8	0.014	~0.007 ^b	<0.27	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH197.1	<i>HasA</i> , <i>gimU</i> (from <i>Pseudomonas putida</i> KT2440) and <i>HasC</i> coexpression	MEK700 with glucose: 40	Between 0.3 and 0.4	0.017	~0.003 ^b	>0.67	
<i>Agrobacterium</i> sp ATCC31749	Coexpression of HA synthase from <i>Pasteurella multocida</i> , and UDP-glucose dehydrogenase from <i>Escherichia coli</i>	MEK700 with glucose: 40	Between 0.3 and 0.4	0.027	~0.01 ^b	<0.27	
<i>Agrobacterium</i> sp LITU261	Coexpression of HA synthase from <i>Pasteurella multocida</i> , and UDP-glucose dehydrogenase from <i>Escherichia coli</i>	CGXII with glucose: 40	Between 1.0 and 1.3	0.014	~0.003 ^b	>1.4	
<i>Agrobacterium</i> sp LITU265	Coexpression of HA synthase from <i>Pasteurella multocida</i> , and UDP-glucose dehydrogenase from <i>Escherichia coli</i>	CGXII with glucose: 40	Between 0.3 and 0.4	0.026	~0.01 ^b	<0.27	
<i>Escherichia coli</i> JM109	Co-expression of HA synthase from <i>Pasteurella multocida</i> and uridine diphosphate-glucose dehydrogenase from <i>E. coli</i> K5 strain	Sucrose: ~42.8, Lactose: 3.4	Between 1.0 and 1.3	0.017	~0.003 ^b	>1.4	
<i>Escherichia coli</i> OP50	CP51 cDNA from <i>C. neoformans</i>	Terrific Broth/feeding medium contained 0.50 glucose (after feeding: glucose: 50) (Bioreactor)	2.0	0.027	0.5 ^b	1.56	[47]
<i>Escherichia coli</i> x1448	Transposon 916 insertional mutagenesis was subcloned into a plasmid shuttle vector (pPD4.1, pPD41.Δ4, pPD41.Δ5 and pPD41.Δ6)	NR	NR	NR	0.38 ^b	2.17	
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 sseAB	Gene of <i>sse HasA</i> with identical protein sequence of <i>seHAS</i> from <i>Streptococcus equisimilis</i>	THY broth	0.002–0.08	NR	0.4 ^b	0.72	
		Glucose: 10 (fed batch)	0.155 (24 h)	0.0155 (24 h) ^a	0.0127	NR	[48]
		Glucose: 50 (Bioreactor)	0.196 (48 h)	0.0196 (48 h) ^a	~4 ng/hr/μg protein	NR	[39]
			0.202 (72 h)	0.0202 (72 h) ^a	NR	NR	[64]
					NR	NR	[69]
					0.0065 (24 h)	0.38 (24 h)	
					0.0041 (48 h)	0.5 M (48 h)	
					0.0028 (72 h)	1.7 (72 h)	

Table 3 continued

Microorganism	Genetic modification	Substrate concentration (g/L)	Production (g/L)	Yield $Y_{P/S}$ (g/g)	Productivity (g/L/h)	Molecular weight (MDa)	Reference
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 sseABC	Gene of sse HasA with identical protein sequence of seHAS from <i>Streptococcus equisimilis</i>	Glucose: 10 (fed batch)	0.148 (48 h)	0.0148 ^a	0.0031	0.39	[69]
<i>Escherichia coli</i> C0 Top10/ (pMBAD-sseABC, pHACM-blank)	Two plasmids and the chromosomal copies of wildtype rpoD and rpoS.	Glucose: 10 (fed batch)	0.405	0.0405 ^a	0.008	NR	[92]
<i>Escherichia coli</i> C1 Top10/ (pMBAD-sseABC)	Used as the control strain in library screening, harboring a single plasmid and the chromosomal copies of wild type rpoD and rpoS	Glucose: 10 (fed batch)	0.510	0.0510 ^a	0.0106	NR	[92]
<i>Escherichia coli</i> D72 Top10/ (pMBAD-sseABC, pHACM-rpoDM72)	Extra copy of mutant rpoD or rpoS in the pHACM plasmid	Glucose: 10 (fed batch)	0.561	0.0561 ^a	0.0117	NR	[92]
<i>Escherichia coli</i> D2 Top10/ (pMBAD-sseABC, pHACM-rpoDM2)	Extra copy of mutant rpoD or rpoS in the pHACM plasmid	Glucose: 10 (fed batch)	0.548	0.0548 ^a	0.0114	NR	[92]
<i>Escherichia coli</i> S47 Top10/ (pMBAD-sseABC, pHACM-rpoSM47)	Extra copy of mutant rpoD or rpoS in the pHACM plasmid	Glucose: 10 (fed batch)	0.479	0.0479 ^a	0.00998	NR	[92]
<i>Escherichia coli</i> D0 Top10/ (pMBAD-sseABC, pHACM-rpoD)	With an extra copy of unmutated rpoD on pHACM;	Glucose: 10 (fed batch)	0.425	0.0425 ^a	0.009	NR	[92]
<i>Escherichia coli</i> S0 Top10/ (pMBAD-sseABC, pHACM-rpoS)	With an extra copy of unmutated rpoS on pHACM;	Fed batch of glucose: 10	0.696	0.0696 ^a	0.015	NR	[92]
<i>Streptomyces albulus</i> pJHA4	hasA gene from 29 <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Fed batch of glucose glucose: 50	6.2	0.062 ^a	0.886 ^b	2	[70]
<i>Bacillus subtilis</i>	Operon containing HA synthase (<i>HasA</i>) of <i>Streptococcus</i> , tuad (<i>hasB</i>)	Fed batch rate of sucrose: 2	NR	1	NR	4.0	[71]
<i>Bacillus subtilis</i>	Operon containing HA synthase (<i>HasA</i>) of <i>Streptococcus</i> , tuad (<i>hasB</i>) and <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin (<i>VHb</i>)	Glucose: 10	1.8	0.18 ^a	0.6 ^b	NR	[64]
<i>Bacillus subtilis</i>	Operon containing HA synthase (<i>HasA</i>) of <i>Streptococcus</i> and tuad controlled by inductive promoters	Glucose: 10	6.8	0.68 ^a	0.34 ^b	6.5	[72]

NR not reported

^a Calculated from the values reported by the authors of the maximum production of HA (P) and the consumed substrate (S), defined as Yield = P/S^b Calculated from the values reported by the authors of the maximum production of HA (P) and the cultivation time to obtain this production (t), defined as Productivity = P/t

concentrations in the metabolic pathway, some vectors were constructed containing the genes *HasB*, *HasC*, and *glmU* (from *Pseudomonas putida* KT2440 strain) or hemoglobin from bacteria (*vgb* from *Vitreoscilla* sp.) [97]. The strains which co-expressed *HasB*, *HasC* or *glmU* had no result on HA yield and did not improve the MW of the product (Table 3). In contrast, co-expression of *vgb* decreased HA yield approximately 1.5-fold and did not affect the MW of the product. This study also analyzed how the media composition affect the HA production and MW, and observed that when using the medium CGXII, a production of 1.2 g/L was achieved, while the MEK700 medium production was almost 3.5 times less. On the other hand, the MW obtained in the MEK700 medium was greater (1.4 MDa) than was obtained in the CGXII medium (<0.27 MDa) (Table 3).

Agrobacterium sp. The *Agrobacterium* ATCC31749 strain is known as a curdian polysaccharide producer. The efficient production of this glucose polymer implicates an effective mechanism for sugar nucleotide UDP-glucose synthesis, demonstrating a natural tendency for synthesizing the sugar nucleotide precursor, UDP-glucose [98].

However, HA production studies using *Agrobacterium* as the host are limited. A single study explored three *Agrobacterium* strains as the host for HA synthesis through the expression of the *pmHas* gene from *P. multocida*: *Agrobacterium* sp. ATCC31749, an over-producing curdian strain and *Agrobacterium* sp. LTU261 and LTU265, with defects in curdian synthesis regulation and transport, respectively [58]. The recombinant strains had the ability to synthesize HA with production levels resulting in 3.0, 2.3 and 2.4 g/L, respectively, and with a MW around 1.56, 2.17 and 0.72 MDa, respectively, as indicated in Table 3. The HA MW produced from *Agrobacterium* sp. LTU261 was approximately 1.3 times greater than commercial HA extracted from *Streptococcus* (Table 3).

Escherichia coli The first use of recombinant *E. coli* for HA production was to validate the function of the encoding gene for the HAS from *S. pyogenes* Group A [64]. In the early 2000s, the use of a recombinant *E. coli* showed the possibility of producing human HAS [40]. Therefore the first human HAS successfully expressed in *E. coli* was the catalytic region of human HAS2 isoform. Nevertheless, the levels of HA produced were not reported in this study [40]. In 2007, CPS1 cDNA from *C. neoformans* was expressed in *E. coli* OP50 and resulted in a strain that was able to synthesize HA with a productivity of 4 ng/hr/ μ g total protein (Table 3) [50].

In recent years, more efficient production in *E. coli* has been achieved through codon optimization,

overexpression of *HasB* and random mutagenesis, as shown in Table 3 [79, 99]. Different fermentation profiles have shown that HA MW and concentration were increased from 0.38 to 1.9 MDa and from 0.148 to 0.202 g/L, respectively [79] (Table 3).

In a follow up study, a strain of *E. coli* was successfully engineered to produce HA through the expression of *pmHas* gene from *P. multocida* subsp. *multocida* [59]. The strain produced about 0.5 g/L HA cultured in shake flask and about 2.0–3.8 g/L in a fed-batch fermentation process in a 1-L fermentor. In the same year, HA production was increased in an *E. coli* strain, JM109, modified to co-produce two enzymes, *P. multocida* HA synthase and *E. coli* K5 UDP-glucose dehydrogenase.

Streptomyces albulus This soil-dwelling actinomycete is known for producing a wide range of bioactive secondary metabolites [100]. It has been proposed that enhancing the amount of intracellular ATP is a good strategy to achieve higher MW HA and improve the productivity in microorganisms [80]. Considering this, *S. zooepidemicus hasA* gene was modified and expressed in the *S. albulus* pJHA4 strain, which has the potential to generate ATP at high levels, under the regulator of a late-log growth phase-operating promoter. This resulted in efficient production of HA in the 2.0 MDa MW range, which is greater than typical bacterial HA (which ranges from 0.5 to 2.0 MDa), indicating that the increased amount of intracellular HA precursors, through higher levels of ATP available to the cell, can lead to increased HA production, achieving 6.2 g/L after 72 h fermentation.

Bacillus subtilis This bacterium is a Gram-positive, spore-forming microorganism found in soil, water and in association with plants. It is one of the most broadly used models for genetic engineering. This bacteria has been utilized for the production of pharmaceuticals due to its well-characterized production of secondary metabolites that can be used as antimicrobial agents [101] and surfactants [102], besides being an important enzyme producer. The use of a *B. subtilis* strain is an excellent strategy for HA production since *B. subtilis* has GRAS status, ensuring that endotoxin-free products can be developed in industrial-scale.

A recombinant *B. subtilis* strain was developed, expressing *S. equisimilis* HA synthase gene, *hasA*, resulting in the production of HA with MW values around 1 MDa (Table 3). The association of *hasA* gene with other genes related to the biosynthesis of UDP-precursors has been tested, resulting in different operons, transformed in recombinant *B. subtilis* strains. It was observed that UDP-glucuronic acid level is a limiting factor for the HA production, in *B. subtilis*. The strategy used for the

development of the recombinant strains was based on the identification of *hasB* homologous genes in *B. subtilis* (*hasB* and *tuaD*) and then overexpressed aiming at increased production level of intermediates for HA biosynthesis. After that, *hasA* was cloned under the control of a strong *S. equisimilis* promoter, called *amyQ*. The product obtained in the *B. subtilis* system was confirmed to be secreted and of similar quality, compared to commercial products [81].

In another study, a plasmid containing a *hasA* gene and the *hasB* gene from *Streptococcus* or *tuaD* (the same activity of *hasB* from *Streptococcus*) in *B. subtilis* were integrated into the *amyE* locus of the *B. subtilis* chromosome [74]. Within this construction, all genes were under the control of a strong constitutive promoter named *VegII* from *B. subtilis*. They coexpressed *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in a *B. subtilis* concomitant to the HA-encoding genes which resulted in a 25 % increased growth rate as well as double the HA production. The strain expressing VHb, *hasA* and *tuaD* under the same regulation obtained HA in a concentration of 1.8 g/L after 30 h of cultivation (Table 3). It has also been shown that cells of *B. subtilis* containing the expression cassette with the *tuaD* gene (1.14 g/L) are 30 % more efficient in producing HA than cells containing only the *hasB* gene (0.84 g/L) [74].

More recently, a two-stage induction strategy has been utilized in the *B. subtilis* 168 (BGSC strain) aimed at increasing HA yield [82]. In this study, two constructions were used: (1) plasmid pAX01, which was used for cloning the HA synthase gene from *P. multocida* (PmHAS); (2) plasmid pHCMC05, which was used for the construction of recombinant operons for the enzymes related to the synthesis of the UDP-precursor sugars. The TPG223 strain was obtained after transformation with both vectors, pAX01-PmHAS and pHCMC05-*tuaD*-*gtaB* (*tuaD* and *gtaB* coding for UDP-GlcUA biosynthesis), this strain achieved HA production of 6.8 g/L and MW of 4.5 MDa (Table 3). Another strategy was designed to test for the UDP-GlcNAc, adding the *gcaD* gene to the system, *gcaD* coding for products related to UDP-GlcNAc biosynthesis. This strain, PG6181, obtained HA production of 2.4 g/L and MW of 0.013 MDa (Table 3). The results observed in those studies point to the relevance of UDP-GlcUA levels to the overproduction of HA in *B. subtilis* expression system.

Eukaryotic organisms

Numerous bacterial systems for the heterologous production of HA have been presented. Nevertheless, in the last few years, the use of eukaryotic organisms has increased. Here we introduce some eukaryotic systems described in the literature that are used for the production of HA.

Yeasts Technologies that use yeast for the production of HA are more advantageous over other methods that are currently available on the market. For instance, there are yeast species that are not pathogenic, and its use for HA production would decrease downstream costs. Additionally, the extensive genomic knowledge of various yeasts together with available genetic tools allows target genetic modification for heterologous production of HA. Moreover, some yeast species already produce the intermediates for HA production such as glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine and, in theory, in those species that require fewer genetic modifications. Finally, some yeast species are already widely used in many industrial processes with known cultivation technologies which could also reduce costs in large-scale HA production. HA production in yeast is not as characterized as in bacteria, however, there are some studies which indicate the possibility of using yeast for the heterologous production of HA.

Saccharomyces cerevisiae This yeast is widely used in industrial processes. Its biology is the most understood of all the yeasts due to its utilization for beer, bread and wine production. Nevertheless, *S. cerevisiae* does not produce HA naturally. Therefore, it was genetically modified nearly 20 years ago for the production of HA [83]. For that, the *hasA* gene DG42 from *Xenopus* was introduced into the *S. cerevisiae* strain using pYES2, an episomal plasmid. The recombinant *S. cerevisiae* INSc1 strain containing the plasmid has been shown to incorporate glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine from exogenously supplied UDP-sugar nucleotides into a high MW polymer and has produced about 1–10 MDa [83].

Pichia pastoris The development of recombinant *P. pastoris* for HA production has been recently described [45]. In this study, strains have been modified with the introduction of five genes: *HasC*, *glmU* (pyrophosphorilase), *pgI* (phosphoglucoisomerase), *HasA* and *HasB* (Fig. 3). In this study, two types of plasmid were utilized: the vector pAO815 and the vector pGAPZB, which have an inductive promoter (AOX) and a constitutive promoter (GAP), respectively. Cassettes containing *HasB*, *HasC*, *glmU* and *pgi* were inserted in different combinations into pGAPZB, whereas cassettes containing *HasA*, *HasB*, *HasC*, *glmU* and *pgi* were inserted into different combinations in pAO815 and both vectors were inserted into *P. pastoris*. The idea was to use the vector containing constitutive promoters to cause an accumulation of both acid precursors in the cell and in a second step activate the inductive promoter preceding the *HasA* gene, leading to increased HA production and higher MW HA. The strategy also included performing fermentation of *P. pastoris* at a temperature below the optimal growth temperature to avoid a

deviation of the carbon flux from the acid precursors for the wall synthesis and consequently increase the production yield of HA. This strategy achieved production values between 0.8–1.7 g/L of HA with a MW in the range of 1.2–2.5 MDa.

Plant cell culture

Plant cell systems for the production of industrial materials show advantages over bacterial and mammalian vectors, such as: (1) the lack of human transmissible viruses and no risk of spongiform encephalopathies transmission; (2) costs related to the production are lower when compared to conventional fermentation processes; (3) as a photosynthetic system which fixates carbon dioxide, can be considered eco-friendly, reducing global warming gases levels [85].

Hyaluronidase is an enzyme that depolymerizes HA and thus increases membrane permeability, decreases viscosity, and makes tissues more readily permeable [103]. It can be used as a “spreading factor”, enabling the diffusion of molecules through the tissues [104]. Four genes coding for hyaluronidases in humans, *rHuHyal-1*, *-2*, *-3* and *-4*, have been successfully expressed and purified using *Nicotiana benthamiana* as host [84]. Experiments performed with those enzymes demonstrated that post-translational protein modifications patterns, biochemical properties and activities were similar to those shown by animal isolated hyaluronidases.

After the transformation of tobacco-cultured cells (BY-2) with a chloroviral HA synthase (cvHAS) gene to produce HA, HA was detected, but not measured by the authors [85].

Patent publications

In accordance with a database containing over 80 million patent documents from about 90 different countries, the number of patent documents containing “hyaluronic acid” in the title is growing every year, as shown in the Fig. 5a. There is a total of 4844 patents containing “hyaluronic acid” (or synonymous words) in the publication title. Most of these publications are related to the development of medical applications and formulations, followed by food and chemical industries (Fig. 5b). Among the techniques used in medical formulations, more than half are associated with the production of cosmetic preparations (62 %), followed by preparations for use in surgeries in various areas (28 %), such as ophthalmology. Still, in relation to patent registry for the production of HA, there is a severe disadvantage in price and purification of HA extraction via animal origin, thus, many methods using plants and microorganisms for the production of HA have emerged. According to a search in the same patent databases listed above, there are different projects using host cells for the production of HA, as illustrated in Table 4.

Conclusions and perspectives

HA has innumerable biological uses in the human body, from signaling processes during embryonic development to wound healing. Furthermore, it is important for the treatment of arthritis and osteoarthritis. Additionally, it has high commercial value compared to extracellular polysaccharides obtained from other microorganisms.

Previously, HA used to be extracted from animal waste. Nowadays, it is being replaced by production through

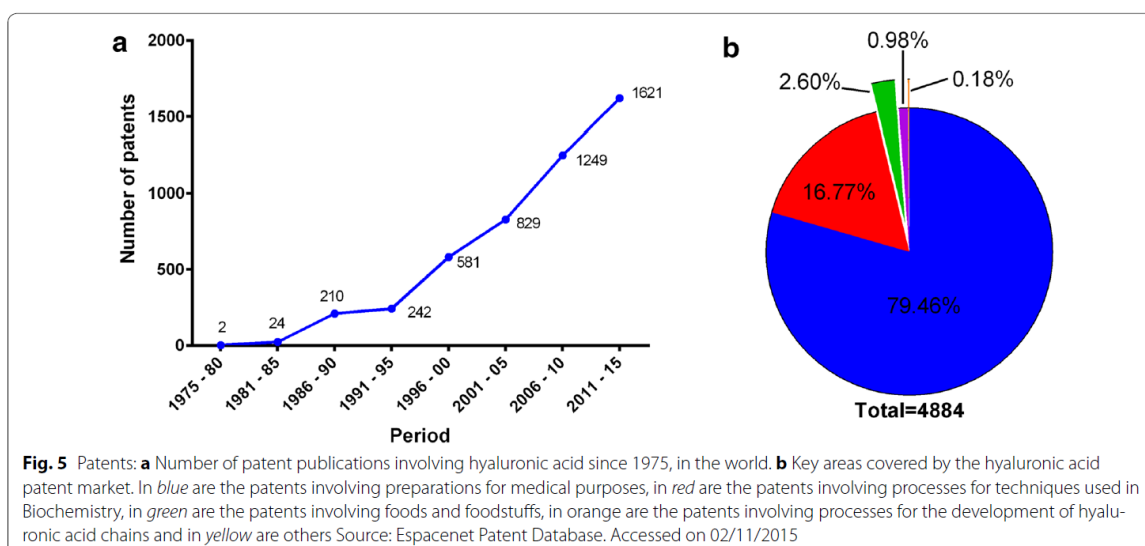


Table 4 Engineered organisms patented for hyaluronic acid synthesis

Host cell	Patent number	Patent date
<i>Escherichia coli</i>	US2014099673 (A1)	10/04/2014
	EP2614088 (A1)	17/07/2013
	CN102154190 (A)	17/08/2011
<i>Bacillus subtilis</i>	EP2614088 (A1)	17/07/2013
<i>Bacillus megaterium</i>	US2014099673 (A1)	10/04/2014
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	CN103993031 (A)	20/08/2014
<i>Streptococcus thermophilus</i>	JP2012130287 (A)	12/07/2012
<i>Pichia pastoris</i>	CN104212732 (A)	17/12/2014
Yeast cell ^a	JP2007174957 (A)	12/07/2007
Alga cell	EP2914716 (A1)	09/09/2015
Plant cell	PT1951878 (E)	08/06/2015
	AU2013201153 (A1)	21/03/2013
	US2009260108 (A1)	15/10/2009
	US2009199311 (A1)	06/08/2009

^a Yeast specie not informed

bacterial fermentation. However, the fact that the microorganisms that naturally produce HA are pathogenic has stimulated studies to obtain this biopolymer using non-pathogenic and industrially friendly microorganisms. Nevertheless, up to now there has been no heterologous host producing as much HA as the natural ones. However, this fact has not discouraged researchers from attempting to obtain an ideal host for the production of heterologous HA. Rather, the search for this organism has included a wide variety of organisms such as bacteria, yeast, plants and virus-infected algae.

Besides the importance of heterologous production of hyaluronic acid by GRAS microorganisms, the research involving this polymer should advance to overcome the challenges regarding the metabolic route of its production. For example: (1) the competition between hyaluronic acid synthesis and cell growth (cell wall biosynthesis) observed in all the producers; (2) the inversely proportional relationship between the high concentration production and high MW; (3) the limitation of the fermentation in the bioreactor when it reaches 10 g/L due to the high viscosity of the medium; (4) the control of the amount of *has* gene transcribed, that directly affects the production of hyaluronic acid and the health of the cell wall (which can make unviable cells); (5) the control and equilibrium of the amount of the both precursors necessary for hyaluronic acid synthesis, where it is previously described that low concentrations of *N*-acetylglucosamine causes an inhibition of the synthesis, (6) the co-production of molecules like lactic acid that inhibits cell growth due to lower pH, and, lastly, (7) the balance between the recycling of cofactors (ATP, UTP and

NADH) available in the cell for the use in the biosynthetic processes. All these challenges require specific studies to increase the knowledge for the HA optimal production conditions.

Furthermore, the advances in genetic engineering tool, especially in the genome editing area should contribute for the development of novel strains over producing HA. Recently, CRISPR/Cas9 technology is attracting more space within the scientific community [105]. After the first use, CRISPR-CAS9 has been used in a wide range of microorganisms, including the bacteria *Escherichia coli* [106] and yeast *Saccharomyces cerevisiae* [107].

However, in literature, there are no reports of any use of CRISPR/Cas9 technology involving heterologous production of hyaluronic acid, perhaps by the very recent nature of the technology. All hyaluronic acid studies involve traditional technologies, such as electroporation techniques, homologous recombination in yeast [45] and gene insertion via plasmid [81]. The possible use of CRISPR/Cas9 in the production of hyaluronic acid could generate some advantages, including: (1) gene insertion in specific regions, such as close of strong promoters, (2) considerable increase efficiency of clones with *has* gene, (3) regulation of genic transcription through the inclusion of transcription factors and (4) repression of genes that act directly or indirectly by inhibiting the synthesis of hyaluronic acid.

Among the microorganisms studied in this review, the yeast *P. pastoris* has been a host with commercial potential to produce HA. This is due to the combination of its production reaching an output of 0.8–1.7 g/L with a MW from 1.2 to 2.5 MDa [45]. Therefore, further studies on heterologous production using *P. pastoris* as a host may allow for greater production yields.

It is worth emphasizing that the ideal molecular size of HA will depend on its application. For example, in order to promote the healing of skin wounds and venous leg ulcers and to manage chronic wounds, a high MW is needed, while in rheumatoid and osteoarthritis, the MW and concentration of synovial fluid-HA are reduced. Additionally, the production mode can interfere directly in the production yield. Therefore, considering a culturing process using two stages (growth and production) could increase HA production, because there is a competition of HA precursors, which are also required for cell wall synthesis, for example.

It is noteworthy that the elucidation of biosynthetic pathways for HA-producing microorganisms and the use of genetic engineering combined with the optimization of biotechnological processes certainly corroborate with the increase of such outcomes in the heterologous production of HA. Therefore, the future

of HA production process will certainly be the association of metabolic engineering and process design strategies.

Abbreviations

HA: hyaluronic acid; UDP-GlcUA: uridine diphosphate glucuronic acid; UDP-GlcNAc: uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine; HAS: hyaluronic acid synthases; GRAS: generally regarded as safe; MDa: megadalton; MW: molecular weight; ATP: adenosine triphosphate; UTP: uridine triphosphate; NAD⁺: nicotinamide-adenine dinucleotide; Acetyl-CoA: acetyl coenzyme A; pmHAS: *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase; Km: Michaelis constant; V_{max}: maximum reaction velocity.

Authors' contributions

All authors participated in the preparation of this contribution. All authors have read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF CEP 70.790-160, Brazil. ² Integra Bioprocessos e Análises, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Edifício CDT, Sala AT-36/37, Brasília, DF CEP 70.904-970, Brazil. ³ Grupo de Engenharia Metabólica Aplicada a Bioprocessos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP 70.790-900, Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

Received: 24 February 2016 Accepted: 22 June 2016

Published online: 01 July 2016

References

- Purcell BP, Kim IL, Chuo V, Guinen T, Dorsey SM, Burdick JA. Incorporation of sulfated hyaluronic acid macromers into degradable hydrogel scaffolds for sustained molecule delivery. *Biomater Sci*. 2009;27:417–28.
- Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem*. 2009;16:1718–45.
- Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*. 1999;7:79–89.
- Fraser JR, Laurent TC. Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp*. 1989;143(41–49):281–5.
- Brewton RG, Mayne R. Mammalian vitreous humor contains networks of hyaluronan molecules: electron microscopic analysis using the hyaluronan-binding region (G1) of aggrecan and link protein. *Exp Cell Res*. 1992;198:237–49.
- Engstrom-Laurent A. Hyaluronan in joint disease. *J Intern Med*. 1997;242:57–60.
- Yanagishita M. Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *EXS*. 1994;70:179–90.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242:27–33.
- Toole B. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: Hay E, editor. *Cell biology of extracellular matrix SE-10*. US: Springer; 1991. p. 305–41.
- Horton MR, McKee CM, Bao C, Liao F, Farber JM, Hodge-DuFour J, Pure E, Oliver BL, Wright TM, Noble PW. Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages. *J Biol Chem*. 1998;273:35088–94.
- Knudson W. Tumor-associated hyaluronan. providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol*. 1996;148(June):1721–6.
- West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res*. 1989;183:179–96.
- Mast BA, Flood LC, Haynes JH, DePalma RL, Cohen IK, Diegelmann RF, Krummel TM. Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: implications for healing by regeneration. *Matrix*. 1991;11:63–8.
- Gold M. The science and art of hyaluronic acid dermal filler use in esthetic applications. *J Cosmet Dermatol*. 2009;8:301–7.
- de Figueirêdo ES, de Macedo AC, de Figueirêdo PFR, de Figueirêdo RS. Use of hyaluronic acid in ophthalmology. *Arq Bras Oftalmol*. 2010;73:92–5.
- Kogan G, Soltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*. 2007;29:17–25.
- Brown MB, Jones SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19:308–18.
- Greenberg DD, Stoker A, Kane S, Cockrell M, Cook JL. Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:814–22.
- Ramos HVL, Neves LR, Martins JRM, Nader HB, Pontes P. Influence of aging on hyaluronic acid concentration in the vocal folds of female rats. 2012;78:14–8.
- Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De. Biotechnological production and application of hyaluronan in biopolymers; 2010. p. 387–412.
- Nesti LJ, Li W-J, Shanti RM, Jiang YJ, Jackson W, Freedman BA, Kuklo TR, Giuliani JR, Tuan RS. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:1527–37.
- Marcellin E, Chen WY, Nielsen LK. Metabolic pathway engineering for hyaluronic acid production. In: Grunwald P, editor. *Carbohydrate modifying biocatalysts*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2011. p. 571–84.
- Murado MA, Montemayor MI, Cabo ML, Vázquez JA, González MP. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food Bioprod Process*. 2012;90:491–8.
- Suri S, Schmidt CE. Photopatterned collagen-hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater*. 2009;5:2385–97.
- Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;66:341–51.
- Yamada T, Kawasaki T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: new approaches. *J Biosci Bioeng*. 2005;99:521–8.
- Boeriu CG, Springer J, Kooy FK, van den Broek LM, Eggink G. Production methods for hyaluronan. *Int J Carbohydr Chem*. 2013;2013:1–14.
- Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact*. 2011;10:99.
- Chong BF, Blank L. Metabolic engineering of hyaluronic acid production. *St Lucia: Dep Chem Eng Univ Queensland*; 1998.
- DeAngelis PL. Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase. *J Biol Chem*. 1999;274:26557–62.
- Tlapak-Simmons VL, Baggenstoss BA, Clyne T, Weigel PH. Purification and lipid dependence of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. *J Biol Chem*. 1999;274:4239–45.
- Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol*. 2014;35:8–13.

33. Berninsone P, Hwang HY, Zemtseva I, Horvitz HR, Hirschberg CB. SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:3738–43.
34. Höflich J, Berninsone P, Göbel C, Gravato-Nobre MJ, Libby BJ, Darby C, Politz SM, Hodgkin J, Hirschberg CB, Baumeister R. Loss of *srf-3*-encoded nucleotide sugar transporter activity in *Caenorhabditis elegans* alters surface antigenicity and prevents bacterial adherence. *J Biol Chem*. 2004;279:30440–8.
35. Tomiya N, Ailor E, Lawrence SM, Betenbaugh MJ, Lee YC. Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells. *Anal Biochem*. 2001;293:129–37.
36. Marshall S, Nadeau O, Yamasaki K. Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels. *J Biol Chem*. 2004;279:35313–9.
37. Kumari K, Weigel PH. Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from Group C *Streptococcus equisimilis*. *J Biol Chem*. 1997;272:32539–46.
38. Jagannath S, Ramachandran KB. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochem Eng J*. 2010;48:148–58.
39. Magee C, Nurminskaya M, Linsenmayer TF. UDP-glucose pyrophosphorylase: up-regulation in hypertrophic cartilage and role in hyaluronan synthesis. *Biochem J*. 2001;360:667–74.
40. Hoshi H, Nakagawa H, Nishiguchi S, Iwata K, Niikura K, Monde K, Nishimura S-I. An engineered hyaluronan synthase: characterization for recombinant human hyaluronan synthase 2 *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2004;279:2341–9.
41. Armstrong DC, Cooney MJ, Johns MR. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1997;47:309–12.
42. Landstein D, Graves MV, Burbank DE, DeAngelis P, Van Etten JL. Chlorella virus PBCV-1 encodes functional glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase and UDP-glucose dehydrogenase enzymes. *Virology*. 1998;250:388–96.
43. Weigel PH. Functional characteristics and catalytic mechanisms of the bacterial hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. 2002;54:201–11.
44. Pummill PE, Achyuthan AM, Deangelis PL. Enzymological characterization of recombinant xenopus DG42, A vertebrate hyaluronan synthase. *Biochemistry*. 1998;273:4976–81.
45. Jeong E, Shim WY, Kim JH. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J Biotechnol*. 2014;185:28–36.
46. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1999;274:25085–92.
47. Itano N, Sawai T, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K, Ohnuki Y. Carbohydrates, lipids, and other natural products: three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1999;274:25085–92.
48. DeAngelis PL, Jing W, Graves MV, Burbank DE, Van Etten JL. Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science*. 1997;278:1800–3.
49. Chang YC, Jong A, Huang S, Zerfas P, Kwon-Chung KJ. CPS1, a homolog of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 polysaccharide synthase gene, is important for the pathobiology of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2006;74:3930–8.
50. Jong A, Wu CH, Chen HM, Luo F, Kwon-Chung KJ, Chang YC, LaMunyon CW, Plass A, Huang SH. Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryot Cell*. 2007;6:1486–96.
51. Gibson JF, Johnston S. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol*. 2014;78:76–86.
52. Rakkhumkaew N, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Prolonged synthesis of hyaluronan by Chlorella cells infected with chloroviruses. *J Biosci Bioeng*. 2013;115:527–31.
53. Graves MV, Burbank DE, Roth R, Heuser J, DeAngelis PL, Van Etten JL. Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae. *Virology*. 1999;257:15–23.
54. Magyar T, Lax A. Bacteria: *Pasteurella multocida*. *Encycl Food Saf*. 2014;1:476–9.
55. Chung JY, Zhang Y, Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;166:289–96.
56. Marcellin E, Steen J, Nielsen LK. Insight into hyaluronan acid molecular weight control. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:6947–56.
57. DeAngelis PL, Jing W, Drake RR, Achyuthan AM. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *J Biol Chem*. 1998;273:8454–8.
58. Mao Z, Chen RR. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnol Prog*. 2007;23:1038–42.
59. Mao Z, Shin HD, Chen R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84:63–9.
60. Kumari K, Weigel PH. Carbohydrates, lipids, and other natural products: molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C *Streptococcus equisimilis* molecular cloning, expression, and characterization of the authentic. *J Biol Chem*. 1997;272:32539–46.
61. Ward PN, Field TR, Ditcham WGF, Maguin E, Leigh JA. Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes *hasA*, *hasB*, and *hasC* in *Streptococcus uberis*. *Infect Immun*. 2001;69:392–9.
62. Blank LM, Hugenholtz P, Nielsen LK. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (*has*) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic Streptococci. *J Mol Evol*. 2008;67:13–22.
63. Chen SJ, Chen JL, Huang WC, Chen HL. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean J Chem Eng*. 2009;26:428–32.
64. DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J Biol Chem*. 1993;268:14568–71.
65. Dougherty B, van de Rijn I. Molecular characterization of *hasA* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A Streptococci. *J Biol Chem*. 1994;269:169–75.
66. Crater DL, Rijn I. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A Streptococci. *J Biol Chem*. 1995;270(31):18452–8.
67. Kim J-H, Yoo S-J, Oh D-K, Kweon Y-G, Park D-W, Lee C-H, Gil G-H. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microb Technol*. 1996;19:440–5.
68. Chen WY, Marcellin E, Hung J, Nielsen LK. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *J Biol Chem*. 2009;284:18007–14.
69. Vázquez J, Montemayor MI, Fraguas J, Murado M. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microb Cell Fact*. 2010;9:46.
70. Duan X-J, Yang L, Zhang X, Tan W-S. Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18:718–24.
71. Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86:273–83.
72. Chien L-J, Lee C-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77:339–46.
73. Prasad SB, Ramachandran KB, Jayaraman G. Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94:1593–607.
74. Chien L-J, Lee C-K. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnol Prog*. 2007;23:1017–22.

75. Sheng JZ, Ling PX, Zhu XQ, Guo XP, Zhang TM, He YL, Wang FS. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer. *J Appl Microbiol*. 2009;107:136–44.
76. Nešvera J, Pátek M. Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90:1641–54.
77. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*. 2003;328:307–17.
78. Mao Z, Shin HD, Chen RR. Engineering the E. coli UDP-glucose synthesis pathway for oligosaccharide synthesis. *Biotechnol Prog*. 2006;22:369–74. doi:10.1021/bp0503181.
79. Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng*. 2008;10:24–32.
80. Yoshimura T, Shibata N, Hamano Y, Yamanaka K. Heterologous production of hyaluronic acid in an ϵ -poly-L-lysine producer *Streptomyces albulus*. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(11):3631–40.
81. Widner B, Von Dollen S, Tang M, Heu T, Sloma A, Sternberg D, Deangelis PL, Weigel PH, Brown S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:3747–52.
82. Jia Y, Zhu J, Chen X, Tang D, Su D, Yao W, Gao X. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresour Technol*. 2013;132:427–31.
83. Deangelis PL, Achyuthan AM. Yeast-derived recombinant DG42 protein of *Xenopus* can synthesize hyaluronan in vitro. *J Biol Chem*. 1996;271:23657–60.
84. Jung Y, Jung MY, Park JH, Jung GC, Hong YS, Yeom CH, Lee S. Production of human hyaluronidase in a plant-derived protein expression system: plant-based transient production of active human hyaluronidase. *Protein Expr Purif*. 2010;74:181–8.
85. Rakkhumkaew N, Shibatani S, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Hyaluronan synthesis in cultured tobacco cells (BY-2) expressing a chlorovirus enzyme: cytological studies. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110:1174–9.
86. Mills S, Griffin C, Coffey A, Meijer WC, Hafkamp B, Ross RP. CRISPR analysis of bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) of industrial *Streptococcus thermophilus* implications for starter design. *J Appl Microbiol*. 2010;108:945–55.
87. Hmar RV, Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis*. *Biotechnol J*. 2014;9(12):1–11.
88. Stuart CH, Schwartz S, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32:93–8.
89. DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem*. 1993;268:19181–4.
90. Eggeling L, Bott M. *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton: CRC Press; 2005.
91. Chassagnole C, Diano A, Létisse F, Lindley ND. Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: first quantitative data and analysis of by-product formation. *J Biotechnol*. 2003;104:261–72.
92. Heider SE, Peters-Wendisch P, Wendisch VF. Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol*. 2012;12:198.
93. Wieschalka S, Blombach B, Eikmanns BJ. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94:449–59.
94. Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, Vertès A, Yukawa H. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005;8:243–54.
95. Smith KM, Cho KM, Liao JC. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87:1045–55.
96. Blombach B, Riestler T, Wieschalka S, Ziert C, Youn JW, Wendisch VF, Eikmanns BJ. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:3300–10.
97. Hoffmann J, Altenbuchner J. Hyaluronic acid production with *Corynebacterium glutamicum*. Effect of media composition on yield and molecular weight. *J Appl Microbiol*. 2014;117(3):663–78.
98. Ruffing A, Mao Z, Chen RR. Metabolic engineering of *Agrobacterium* sp. for UDP-galactose regeneration and oligosaccharide synthesis. *Metab Eng*. 2006;8:465–73.
99. Yu H, Tyo K, Alper H, Klein-Marcuschamer D, Stephanopoulos G. A high-throughput screen for hyaluronic acid accumulation in recombinant *Escherichia coli* transformed by libraries of engineered sigma factors. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101:788–96.
100. Dodd A, Swanevelter D, Featherston J, Rumbold K. Draft genome sequence of *Streptomyces albulus* strain CCRC 11814, an {varepsilon}-poly-L-lysine-producing Actinomycete. *Genome Announc*. 2013;1:e00696.
101. Wang T, Liang Y, Wu M, Chen Z, Lin J, Yang L. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chin J Chem Eng*. 2015;23:744–54.
102. Al-Ajlani MM, Sheikh MA, Ahmad Z, Hasnain S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmaceutical commercial medium. *Microb Cell Fact*. 2007;6:17.
103. Farr C, Menzel J, Seeberger J, Schweigle B. Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to hylase “Dessau”. *Wien Med Wochenschr*. 1997;147:347–55.
104. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 2007;80:1921–43.
105. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816–21.
106. Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:2506–14.
107. Dicarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:4336–43.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



7.4 Anexo 4 - Relatório Descritivo de Patente (BR10201500745)

LEVEDURA RECOMBINANTE ASSOCIADA A TRANSPORTADORES DE LACTATO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO UTILIZANDO GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO


[001] O presente pedido de patente de invenção está relacionado ao campo da Biotecnologia, que é a utilização de produtos ou processos biológicos na solução de problemas técnicos. Mais especificamente, trata-se de um processo biotecnológico de geração de um insumo, L-ácido lático, através do consumo de glicerol provindo da produção de biodiesel, para a produção de poli-ácido-lático (PLA), mediante a utilização de engenharia genética de leveduras.

RESEARCH

Open Access



Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*

Pollyne Borborema Almeida de Lima^{1†}, Kelly Cristina Leite Mulder^{4†}, Nadiele Tamires Moreira Melo², Lucas Silva Carvalho², Gisele Soares Menino⁴, Eduardo Mulinari⁴, Virgilio H. de Castro⁴, Thaila F. dos Reis³, Gustavo Henrique Goldman³, Beatriz Simas Magalhães^{2,4} and Nádia Skorupa Parachin^{1*} 

Abstract

Background: Crude glycerol is the main byproduct of the biodiesel industry. Although it can have different applications, its purification is costly. Therefore, in this study a biotechnological route has been proposed for further utilization of crude glycerol in the fermentative production of lactic acid. This acid is largely utilized in food, pharmaceutical, textile, and chemical industries, making it the hydroxycarboxylic acid with the highest market potential worldwide. Currently, industrial production of lactic acid is done mainly using sugar as the substrate. Thus here, for the first time, *Pichia pastoris* has been engineered for heterologous L-lactic acid production using glycerol as a single carbon source. For that, the *Bos taurus* lactate dehydrogenase gene was introduced into *P. pastoris*. Moreover, a heterologous and a novel homologous lactate transporter have been evaluated for L-lactic acid production.

Results: Batch fermentation of the *P. pastoris* X-33 strain producing LDHb allowed for lactic acid production in this yeast. Although *P. pastoris* is known for its respiratory metabolism, batch fermentations were performed with different oxygenation levels, indicating that lower oxygen availability increased lactic acid production by 20 %, pushing the yeast towards a fermentative metabolism. Furthermore, a newly putative lactate transporter from *P. pastoris* named PAS has been identified by search similarity with the lactate transporter from *Saccharomyces cerevisiae* Jen1p. Both heterologous and homologous transporters, Jen1p and PAS, were evaluated in one strain already containing LDH activity. Fed-batch experiments of *P. pastoris* strains carrying the lactate transporter were performed with the batch phase at aerobic conditions followed by an aerobic oxygen-limited phase where production of lactic acid was favored. The results showed that the strain containing PAS presented the highest lactic acid titer, reaching a yield of approximately 0.7 g/g.

Conclusions: We showed that *P. pastoris* has a great potential as a fermentative organism for producing L-lactic acid using glycerol as the carbon source at limited oxygenation conditions (below 0.05 % DO in the bioreactor). The best strain had both the LDHb and the homologous lactate transporter encoding genes expressed, and reached a titer 1.5 times higher than the strain with the *S. cerevisiae* transporter. Finally, it was also shown that increased lactic acid production was concomitant to reduction of acetic acid formation by half.

Keywords: L-Lactic acid, *Pichia (Komagataella) pastoris*, Lactate transporter, Oxygen limited fermentation, Lactate dehydrogenase

*Correspondence: nadiasp@gmail.com

[†]Pollyne Borborema Almeida de Lima and Kelly Cristina Leite Mulder contributed equally to this work

¹ Grupo de Engenharia Metabólica Aplicada a Bioprocessos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP 70.790-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Bio-based chemical production from renewable sources has received considerable attention in recent decades due to both economic and environmental concerns, such as the price of petroleum-derived compounds and the effect of residue accumulation on the Earth [1]. Therefore, biotechnological routes using raw materials and renewable sources for the production of bulk chemicals have been studied as an important alternative to conventional petroleum-based processes [2, 3].

Among available raw materials, crude glycerol has gained attention in recent years for being the main waste product in the conversion of vegetable oils into biodiesel. Brazil is the second largest biodiesel producer reaching a production capacity in May 2016 of 19,976.81 m³/day of pure biodiesel, resulting in approximately 1997.7 m³/day of crude glycerol [4]. Therefore, with the aim of developing strains that will further be able to use crude glycerol as a carbon source, glycerol was used in this study as the substrate for genetically engineered *Pichia pastoris* strains to produce lactic acid. Recent studies have reported metabolically-engineered microorganisms such as *Escherichia coli* [5, 6], *Rhizopus oryzae* [7] and *Enterococcus faecalis* [8] for improving lactic acid (2-hydroxypropanoic acid) production using glycerol as a single carbon source. However, bacteria have to overcome low tolerances toward acidity when producing lactic acid, while yeasts are generally resistant to low pHs. In addition, yeasts are generally robust and resistant microorganisms which can survive in industrial conditions, and are thus easy to use in scale-up bioprocesses [9].

Lactic acid is an organic acid commonly produced by diverse organisms such as bacteria (e.g. *Corynebacterium glutamicum* and *Bacillus* strains), fungi (e.g. genus *Rhizopus*), yeasts (*Saccharomyces* and *Kluyveromyces* genera), and microalgae (e.g. *Scenedesmus obliquus*) [10]. It is currently utilized in food, pharmaceutical, textile, leather, and chemical industries, making it the hydroxycarboxylic acid with the highest market potential worldwide [11]. Moreover, lactic acid is the monomer used for the production of biodegradable poly-lactic acid (PLA) that can be used in automobile, packaging and cosmetic industries [10]. PLA is essentially produced by the direct polymerization of lactic acid, and has its physical and mechanical properties determined by the purity of the two lactic acid optical isomers, L- and D-lactic acid [12]. Therefore, depending on the characteristics of the desired PLA, both isoforms have to be produced independently so they can be used in correct proportions.

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* naturally grows in high densities on different carbon sources such as glucose, glycerol, methanol, and sugar alcohols [13]. On account of its ability to grow on defined medium

achieving high cell densities and its preference for respiratory mode, decreasing the excretion of by-products like acetate and ethanol, this system is a powerful candidate for utilization at the industrial scale [14]. Moreover, methanol, the primary contaminant of crude glycerol, has no negative impact on *P. pastoris* growth [15]. In fact, this microorganism has higher biomass production growing in crude glycerol than in pure glycerol, indicating that *P. pastoris* can even utilize the contaminants from the biodiesel transesterification process for biomass formation [16].

In this study, for the first time, the LDH encoding gene of lactate dehydrogenase from *Bos taurus* was cloned under the control of the GAP constitutive promoter and introduced into *P. pastoris* strains. Nevertheless, the obtained yield was only 10 % of what is theoretically possible. In order to evaluate whether L-lactic acid production could be improved, different oxygenation conditions were tested. Moreover, two lactate transporter coding-genes were also evaluated: the lactate transporter Jen1p from *Saccharomyces cerevisiae* and the putative *P. pastoris* lactate transporter, identified for the first time in the present work. All constructed strains were evaluated in fed-batch experiments for glycerol consumption and lactic acid production. The best strain containing both LDH and Lactate transporter activity reached 70 % of yield.

Results

L-lactic acid production in *P. pastoris*

The codon-optimized *ldh* encoding-gene from *B. taurus* was introduced into the *P. pastoris* genome by homologous recombination. The selected colonies were grown in selective medium and were used to measure LDH-specific activity. All colonies showed LDH activity with statistical differences compared to the wild-type strain, however, one clone demonstrated higher activity among the selected clones (data not shown), here named XL (Table 1). In order to test the physiological behavior of XL, batch fermentation containing 4 % glycerol was performed and proved its ability to convert glycerol into lactic acid, confirming heterologous LDH production [17].

Pichia pastoris is an obligate aerobic yeast [18]. In order to evaluate whether oxygen limitation would improve lactic acid production, batch cultivations were performed at two different dissolved oxygen levels, 3 and 5 %. When supplied with 3 % dissolved oxygen, the XL strain had a lactate yield (lac/s) of 0.236 g/g, and when supplied with 5 % dissolved oxygen, it had 20 % lower yield ($Y_{lac/s}$ of 0.196 g/g). Moreover, XL μ_{max} at 3 % was about 10 % lower (0.174) than at 5 % (0.189) indicating a higher conversion of glycerol into biomass when higher amounts of dissolved oxygen are supplied, lowering the production of lactic acid (Fig. 1).

Table 1 Plasmids and strains used in this work

Plasmids/strains	Genotype	Reference
<i>Plasmids</i>		
pGAPZB	<i>Pichia</i> integrative plasmid; Zeocin [®] selection; Expression controlled by constitutive GAP promoter	Invitrogen [®]
pPICPGKGF	Green Fluorescent encoding gene cloned under the control of PGK promoter	Personal communication
pGAP-LDH	LDH ⁺ , <i>Bos taurus</i> gene encoding for LDH enzyme	This work
pPGK-JEN	JEN1 ⁺ , <i>S. cerevisiae</i> gene-encoding for the lactate transporter Jen1p	This work
pPGK-PAS	PAS ⁺ , <i>P. pastoris</i> gene-encoding for a putative lactate transporter PAS	This work
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α [™]	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Life technology
DH10B [™]	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ -	Life technology
<i>P. pastoris</i> strains		
X-33	Wild type	Life technology
XL	X-33 + pGAP-LDH	
GS115	his4 ⁻	Life technology
GJ	his4 ⁻ + pPGK-JEN	This work
GLJ	his4 ⁻ + pGAP-LDH + pPGK-JEN	This work
GS	his4 ⁻ + pPGK-PAS	This work
GLS	his4 ⁻ + pGAP-LDH + pPGK-PAS	This work

Identification of a putative lactate transporter in *P. pastoris* and ¹⁴C lactate transport assay

In *S. cerevisiae*, the activity for the lactate-proton symporter has been described to be dependent on JEN1 gene expression [19]. Expression of *S. cerevisiae* Jen1p lactate transporter in reconstituted heterologous *P. pastoris* membrane vesicles demonstrated that Jen1p is a functional transporter [20]. A BLAST search (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) aiming to identify the *jen1* orthologous gene in the *P. pastoris* genome was performed and revealed an open reading frame with significant similarity (50.19 % identity). The protein of the putative homologue, PAS, was predicted to have 552 amino acids in length and to belong to the proton-linked monocarboxylate transporter family (accession number: XM_002492622.1). The Jen1p proteins contained 12 of the predicted transmembrane segments, while PAS contained only 10 helices.

Subsequently, the *PAS* gene was inserted into the *P. pastoris* GS115 strain under the control of the phosphoglycerate kinase 1 promoter, resulting in the GS strain (Table 1). Similarly, the *jen1* gene of *S. cerevisiae* was inserted into GS115 strain, resulting in the GJ strain (Table 1). Both strains, including the control (GS115), were used for the ¹⁴C lactate transport assay (Fig. 2 and Table 2). Nevertheless, no significant difference was found in the strain containing the *jen1* gene and therefore this data is not shown.

The lactate transport by the GS115 and GS strains was assayed using radiolabeled lactate. Both GS and the wild-type strain (GS115) were incubated in the presence of ¹⁴C lactate, and the uptake capacity was further measured (Fig. 2). As can be seen in Fig. 2, the *P. pastoris* GS115 strain showed a higher velocity of transport, indicating that the GS strain rather increased the affinity for lactate. When Km and Vmax were calculated for all strains, these results were confirmed, where GS showed an increase of about threefold in affinity for lactate when compared with GS115 (Table 3).

Insertion of lactate-transporters results in increased lactate production in fed-batch fermentation

Once confirmed that *P. pastoris* could produce lactic acid using glycerol as a single carbon source and that the strains GS and GJ presented a higher affinity towards lactate when compared to the control strain, all constructed strains were evaluated for lactic acid production. To that end, fed-batch fermentation of the XL, GLJ and GLS strains was performed. Fed-batch was composed of two phases: the first one favoring biomass formation in aerobic conditions and the second initiated by the pH level change (>5) with a single pulse addition of 4 % glycerol and hypoxia conditions.

It can be observed that the GJ strain, although having shown higher affinity than the control strain towards lactate in the radiolabeled assay, presented a slightly higher

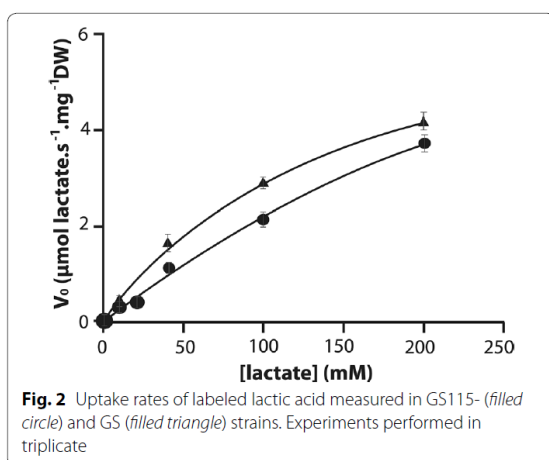
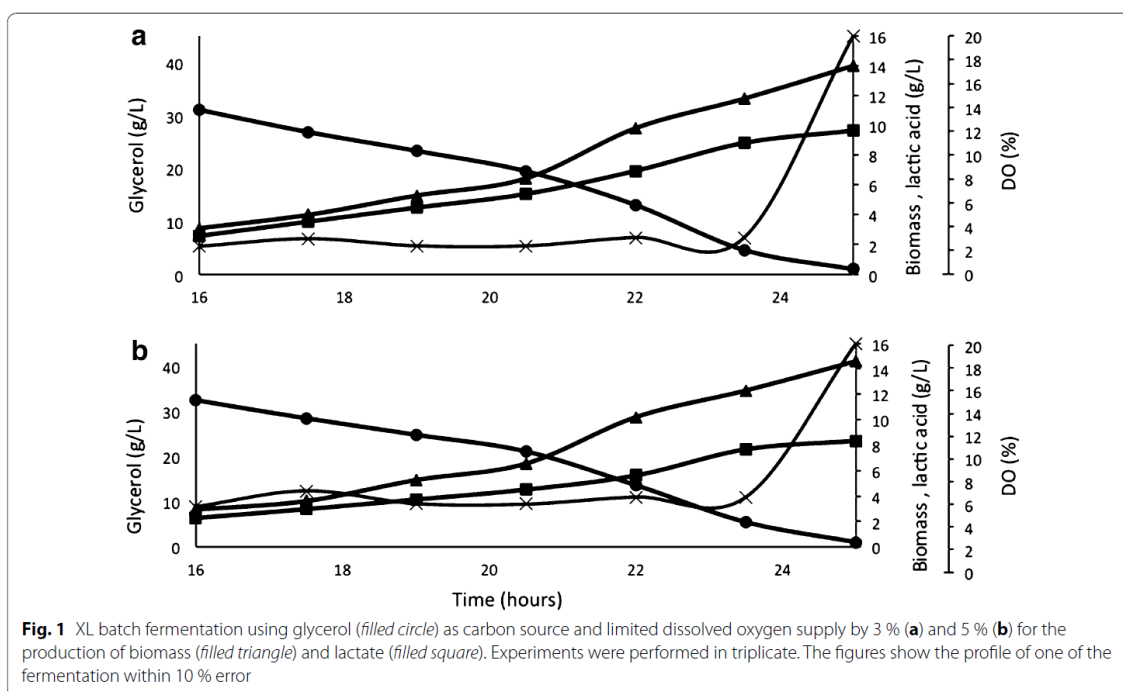


Table 2 V_{max} and K_m of GS115 and GLS strains determined by using radiolabeled lactate

Strain	V_{max} ($\mu\text{mol/s mg}$)	K_m (μmolar)
GS115	11.68 ± 2.09	430.70 ± 105.00
GLS	7.54 ± 0.67	157.40 ± 25.46

lactate yield (2 %) when evaluated in a fed-batch experiment. On the other hand, GLS presented the highest lactate yield compared to XL and GLJ (46 and 43 % higher, respectively) (Fig. 3), as well as the highest lactate specific (0.126/h) and volumetric (0.673 g/L/h) productivity rates (Table 3). Moreover, at the fed-phase, GLS presented simultaneously the lowest biomass (approximately three-fold) and acetate (2.5-fold) yields, showing that this strain is directing carbon towards lactate production instead of biomass formation. By-products such as acetate, arabinol and ethanol were also evaluated, and the kinetic parameters of the fed-phase showed that both XL and GLJ strains presented acetate approximately twofold higher yields, which is an indication of their lower lactate production (Table 3). For GLS, the increase in lactate yield was simultaneous with the reduction in arabinol, was close to zero in all strains and ethanol was never detected (data not shown).

Discussion

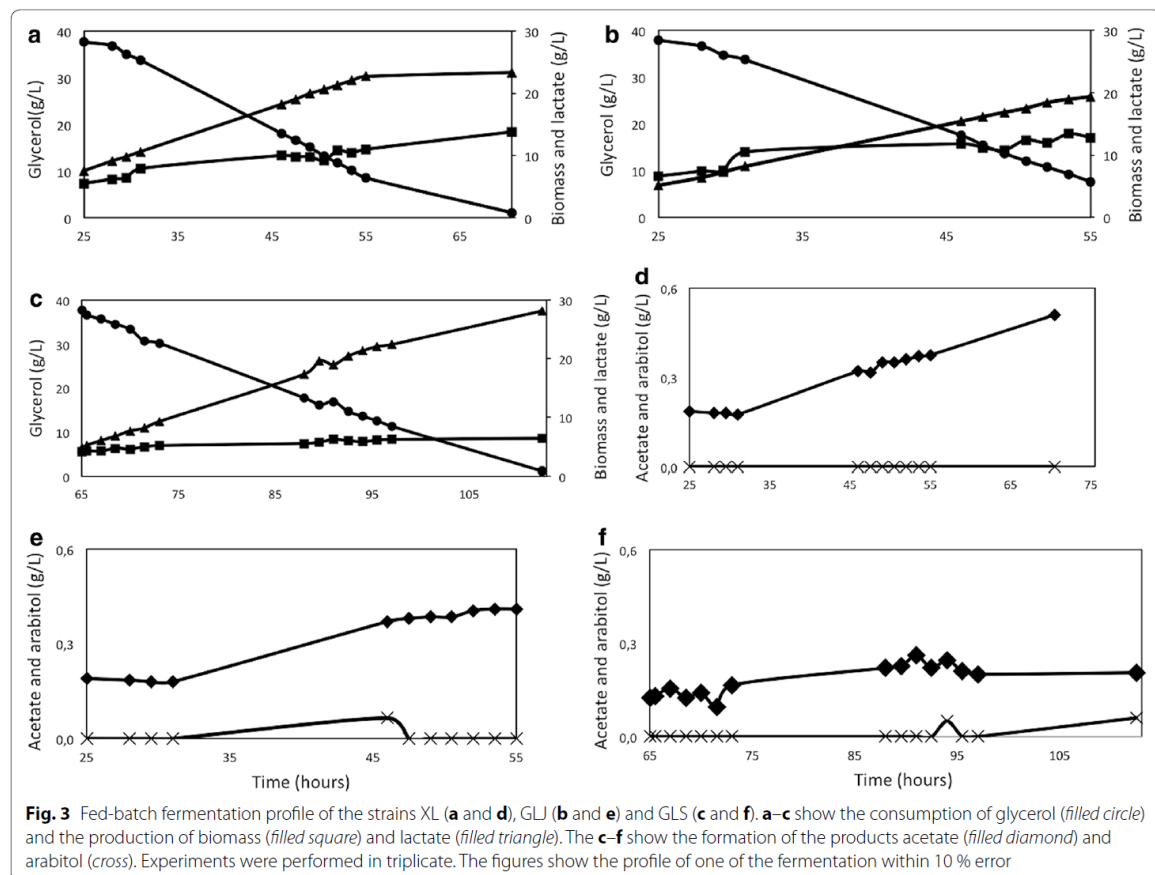
Limiting oxygen increases the production of L-lactic acid by *P. pastoris*

Pichia pastoris is a highly successful candidate for the production of heterologous protein (for review, see [21, 22]), however, few studies have been performed using the metabolic engineering of this microorganism [23–25].

Table 3 Kinetic parameters during fed-batch experiments at limited aerobic phase

Strain	$Y_{x/s}$	$Y_{lac/s}$	$Y_{ac/s}$	$Y_{ara/s}$	q_x	q_{lac}	q_{ac}	q_{ara}	r_x	r_{lac}	r_{ac}	r_{ara}
XL	0.180 ± 0.004	0.460 ± 0.004	0.008 ± 0.001	0.000 ± 0.000	0.020 ± 0.004	0.053 ± 0.012	0.001 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.117 ± 0.025	0.348 ± 0.073	0.006 ± 0.001	0.000 ± 0.000
GLJ	0.177 ± 0.004	0.470 ± 0.035	0.010 ± 0.005	0.000 ± 0.000	0.024 ± 0.003	0.063 ± 0.003	0.001 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.160 ± 0.054	0.413 ± 0.101	0.001 ± 0.004	0.000 ± 0.004
GLS	0.066 ± 0.004	0.673 ± 0.033	0.004 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.146 ± 0.016	0.001 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.065 ± 0.005	0.673 ± 0.041	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.000

Y yield, s substrate, x biomass, lac lactate, ac acetate, ara arabitol, Y g/g, q g/g/h, r g/L/h



Our study shows for the first time that genetically engineered *P. pastoris* strains containing LDH activity are able to produce lactic acid from glycerol. The use of glycerol by *P. pastoris* for the production of other biotechnological products such as phytase and recombinant human erythropoietin production has been previously reported [15, 26], making this organism a potential route for the conversion of crude glycerol into products of

biotechnological interest. Introduction of LDH activity from *B. taurus* resulted in a lactate yield per consumed substrate 52 % higher than what has been previously found for the introduction of the same gene in *S. cerevisiae* ($Y_{lac/s}$ 0.155 g/g) using glucose as substrate [18]. Furthermore, lactate production could be further improved by restricting oxygen limitation in the bioreactor [27, 28]. Our results suggest that a lower dissolved oxygen

supply can provide higher production of heterologous lactic acid, which can be an effect of both increased yeast fermentation capacity and up regulation of the pGAP promoter. In a previous study, evaluation of heterologous production of a Fab fragment under the control of a pGAP promoter and limited oxygen conditions (8.39 and 5.87 %) showed that biomass yield decreased twofold while heterologous protein production increased by 2.5-fold [29]. It has been recently evaluated whether oxygen transfer affects protein production under the control of the pGAP by *P. pastoris*. It was observed that 20 % air saturation showed the highest volumetric activity of glucose isomerase when compared to 15 % DO [30]. Although we have not evaluated the enzyme activity in different aeration conditions, our result indicates that limiting oxygen availability pushes the yeast metabolism towards the fermentative pathway.

New putative lactate transporter from *P. pastoris*

Since the identification of *JEN1* coding for the lactate transporter in *S. cerevisiae* [19], it was reported that the Jen1p transporter was able to reconstitute the lactate permease activity in *P. pastoris* [20]. Moreover, in the previous study the background activity of the control strain (KM71H) could not be measured and the kinetic parameters V_{max} (2.15 ± 0.14 nmol of lactic acid/s mg of dry weight) and K_m (0.54 ± 0.08 mM) could only be determined for the recombinant strain producing the Jen1p transporter [20]. In the present study we did not see a significant difference between the control strain and the one over producing Jen1P, despite a tendency of the GJ strain has a greater affinity to lactate. Regarding the strains overproducing the putative lactate transporter from *P. pastoris*, GS strain, it showed a threefold higher affinity to lactate compared with control strain.

GLS strain provides the highest lactate secretion in fed-batch

Among tested strains and fermentation modes, the best performance was achieved by GLS in oxygen limited fed-batch fermentation. Production of lactic acid using glycerol has been reported using other organisms such as the Gram-positive lactic acid bacteria *E. faecalis* [3]. This later study used fed batch with 30 g/L of glycerol coupled with 22 g/L of acetic acid as substrate and they achieved a lactic acid volumetric productivity rate 7 % higher than what was achieved in our study using the GLS strain. Another study evaluated the production of lactic acid using the fungi *Rhizopus oryzae* in a batch fermentation with 40 g/L of crude glycerol plus either inorganic nutrients of lucern green juice [7]. In both cases the total amount of lactic acid at the end of the fermentation was approximately 12 % lower than what has been found in

the present study. Although these studies have shown the production of lactic acid using either crude or pure glycerol, they did not use engineered strains like the one presented here.

It has been previously reported that the cost of bio-production of polylactic acid depends on the substrate used in its process [31]. Crude glycerol is obtained as a residue from the conversion of vegetable oils into biodiesel. It is estimated that for every 9 kg of biodiesel produced, 1 kg of crude glycerol is generated [32]. Thus, for its high availability and low cost, crude glycerol is an excellent candidate for high-added-value chemical production including lactic acid [4, 33, 34, 35]. We have developed a novel *P. pastoris* engineered strain that produces lactic acid using pure glycerol as unique carbon source. Our strain GLS, which has achieved the highest L-lactic acid yield of 0.7 g/g, shows a result close to the maximum theoretical yield of 1.0 g/g.

Conclusions

This study has shown for the first time that genetically engineered *P. pastoris* strains are able to produce L-lactic acid, making this organism a potential biocatalyst for the conversion of crude glycerol into products of biotechnological interest. Another novelty of this study is the identification of a putative lactate transporter in *P. pastoris*. Two genetically modified strains carrying lactate transporters were developed in order to improve the secretion of L-lactic acid. Both strains named GLJ and GLS showed higher affinity towards lactate when compared to the control strain. Fed-batch fermentation processes fed with 40 g/L glycerol showed that GLS presented an increase of 46 % in lactate yield compared to the control strain and 43 % higher than GLJ. The lactate volumetric and specific productivity rates were higher in GLS with a concomitant decrease in biomass and lactate yields of approximately 60 % each were also observed.

Methods

Plasmids and strains

The plasmids and strains used in this study are listed in Table 1. The bacterial strains were grown at 37 °C in Luria broth medium (0.5 % yeast extract, 1 % peptone and 1 % sodium chloride), and the yeast strains were grown at 30 °C in YPD (0.5 % yeast extract, 1 % peptone and 2 % dextrose). When required, the medium were supplemented with the appropriate antibiotics: ampicillin for *E. coli* cultivation (100 µg/mL) and zeocin for *P. pastoris* cultivation (100 µg/mL).

Strain construction

In order to produce lactic acid, the plasmid pGAPZB (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing the *Bos*

Taurus ldh codon-optimized gene was linearized with *AvrII* restriction enzyme (Life technology, San Diego, CA, USA) and integrated by homologous recombination into the *P. pastoris* X-33 chromosomal DNA. The resulting plasmid named pGAP-LDH was synthesized by Genome Company (Madison, WI, USA). The integration was confirmed by resistant clones selected in zeocin (100 µg/mL). The resulting strain was named XL (Table 1). In order to evaluate the influence of the lactate transporter in *P. pastoris* strains producing LDH, the pPICPGKGF plasmid (derived from pPIC9 k-Life technology) was used. pPICPGKGF containing either the codon-optimized gene encoding for the lactic acid transporter *Jen1p* from *S. cerevisiae* or the codon-optimized gene encoding for the putative transporter of *P. pastoris Pas* were developed, resulting in the plasmids pPGK-JEN and pPGK-PAS, respectively (Table 1). The primers used for the construction of pPGK-JEN were JEN-F 5'ATTCGCGG CCGCATGTCGTCGTCGAATTACA3' and JEN-R5' TTAAACGGTCTCAATATGCTGAATTCATC3' (*NotRI* and *EcoRI* restriction sites underlined, respectively), and the primers used for the construction of pPGK-PAS were PAS-F5' ATTCGCGGCCCGCATGTCGCATTCAATCCATT3' and PAS-R5' TTAATTATTCCTCAAAGCC GAATTCATC3' (*NotRI* and *EcoRI* restriction sites underlined, respectively). The plasmids pPGK-JEN and pPGK-PAS were integrated into the GS115 (*his4*) strains using the restriction enzyme *BglII* (Life technology, San Diego, CA, USA). Positive clones were selected in YNB solid medium without amino acids, and the resulting strains were respectively named GJ and GS. Next, GJ and GS strains were transformed with pGAP-LDH, resulting in the strains GLJ and GLS, respectively (Table 1).

Enzyme activities

Enzyme assays were carried out as described previously with modifications [36]. Briefly, a primary inoculum culture was prepared in YPD medium, with zeocin (100 µg/mL), and maintained at 30 °C and 180 rpm overnight. Cells were harvested, re-inoculated in a new flask, and grown in a shaker at 30 °C until the exponential phase. After centrifugation, cells were resuspended in Yeast Protein Extraction Reagent (Y-Per, Life Technologies) for 10 min. The reaction was assembled with cellular extract, 10 µL; NADH, 8 µL; 50 mM phosphate buffer (pH 8.0), 800 µL, and ultra-pure water for a 1 mL final volume. After 150 s, pyruvate 40 µL was added and the reaction was completed in 300 s. Then, LDH activity was determined at 30 °C through the absorbance reduction at 340 nm caused by oxidation of NADH cofactor after pyruvate addition as substrate. The unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to oxidize 1 µmol NADH per minute.

¹⁴C-lactate transport in the strains containing Jen1p and PAS

Radiolabelled lactic acid uptake was determined as described previously [20] with modifications. Briefly, a primary inoculum culture for GS115 (control), GJ and GS strains were prepared in YPD medium and grown until the exponential phase of growth at 30 °C and 180 rpm. Cells were harvested, re-inoculated in YNB medium with 0.5 % L-(+)-lactic acid (Sigma Aldrich Co., USA) for glucose starvation during 4 h in shake at 30 °C. The inoculums were centrifuged at 12,000g for 5 min and washed twice with ice-cold water. Cells were resuspended in KH₂PO₄ 1 M buffer, pH 5.0 and kept at room temperature during experiment. A mix containing 1 µL of [U-¹⁴C] lactic acid (sodium salt; 106.9 mCi/mmol [3.955 GBq/mmol], Perkin Elmer Life Science) and 9 µL of different concentrations of non-radiolabeled lactic acid (Sigma Aldrich Co., USA) was added to 40 µL of washed cells. After 10 s of incubation, the uptake reaction was quenched by the addition of 1 mL of ice-cold water. Cells were quickly filtered through a nitrocellulose filter 0.45 µm (Sartorius, Göttingen, Germany) linked to a vacuum filter system. After extensive washes and removal of the non-incorporated radiolabelled lactic acid, the membranes containing the washed cells were transferred to a scintillation tube containing 3 mL of scintillation fluid (ScientiSafe; Thermo Fisher Scientific, Whatman, MA, USA). The intracellular radioactivity was measured in the Packard Tri-Carb 2200 CA liquid scintillation spectrophotometer with disintegrations per minute correction. To determine the non-specific ¹⁴C adsorption, the labeled lactic acid was added at zero time after the addition of ice-cold water. To determine the transport kinetics that best fit with the experimental values of initial lactate uptake rates and to estimate the kinetic parameters, a computer-assisted non-linear regression analysis was used (GraphPAD software). All experiments were repeated at least three times and the data reported are the average values. For comparison between strains, an ANOVA Tukey Test was used.

Medium for batch and fed-batch

In batch and fed-batch experiments, a defined medium was utilized as previously described with modifications [37]. The composition of the medium (per liter) was: 20 or 40 g glycerol·1H₂O, 1.8 g C₆H₈O₇, 0.02 g CaCl₂·2H₂O, 12.6 g (NH₄)₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.9 g KCl, and 4.35 mL PTM1 trace salts stock solution, and pH was set to 5.0 with 25 % HCl. PTM1 trace salts stock solution (per liter) was composed by: 6.0 g CuSO₄·5H₂O, 0.08 g NaI, 3.0 g MnSO₄·H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.02 g H₃BO₃, 0.5 g CoCl₂, 20.0 g ZnCl₂, 14.3 g FeSO₄ and 5.0 mL H₂SO₄ (95–98 %), 0.4 g biotin. 0.04 g histidin was supplemented for the strain GS115.

Fermentation parameters for batch and fed-batch

For batch experiments, the pre-inoculum culture was prepared with 20 g/L glycerol in 100 mL defined medium in a 1 L flask, and it grew for approximately 48 h at 30 °C and 200 rpm. This pre-culture was then used to inoculate 500 ml defined medium at an initial OD_{600nm} of 2.0 into 1 L Infors HT fermentor (Infors HT, Bottmingen, Switzerland). The glycerol concentration in the defined medium for batch experiments was 40 g/L. To evaluate the production of lactic acid in XL, a batch experiment was performed at the following conditions: 30 °C, 500 rpm, air flow 0.05 vvm, dissolved oxygen at either 5 or 3 % and pH 5 controlled with 5 M NH₄OH. To evaluate the correlation between amount of dissolved oxygen and lactic acid production, a batch fermentation in cascade mode was performed at the following conditions: pH 5 controlled with 5 M NH₄OH, 30 °C, and dissolved oxygen at 3 or 5 % measured by a sterilized electrode (Mettler-Toledo, Moburn, MA, USA), maintained by computational adjustment of the rotation speed (minimum 350/set 500/maximum 900 rpm) and air flow (minimum 0.05/set 0.05/maximum 0.5 vvm). The batch fermentations were run for 30 h. Samples were collected every 90 min and centrifuged at 12,000g for 2 min, then the supernatant was stored at -20 °C for HPLC analysis. For fed-batch, the pre-inoculum was prepared as described above. The fed-batch fermentations were performed with an initial glycerol concentration of 20 g/L at the following conditions: 30 °C, 500 rpm, air flow 0.05 vvm, dissolved oxygen at 30 % and pH 5 controlled with 5 M NH₄OH. When pH went above 5, the feeding step was initiated with the addition of 40 g/L glycerol in a single pulse. Samples were collected every 90 min and centrifuged at 12,000g for 2 min. The supernatant was stored at -20 °C for HPLC analysis.

Substrate consumption, lactic acid, biomass and by-product formation

Acetic acid, ethanol, arabitol, lactic acid and glycerol were quantified using a Hewlett-Packard High-performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with UV (210-nm) and refractive index detectors. A pre-column Guard Column SCR (H) (50 mm × 4 mm id) with stationary phase sulphonated styrene-divinylbenzene copolymer resin was used. The chromatography was performed using a Shim-pack SCR-101H (Shimadzu) (300 mm × 7.9 mm id) column equilibrated at 60 °C with 5 mM H₂SO₄ as the mobile phase at flow rate of 0.6 mL/min, and an injection volume of 20 µL. The run was 26 min long. For the analysis of biomass, dry cell weight (DCW) samples were collected for OD_{600nm} measurement and the same sample was dried

then weighed. OD_{600nm} was converted to DCW (g/L) using the appropriate calibration curve; 1 unit of OD_{600nm} corresponded to 0.390 g DCW/L.

Authors' contributions

PBAL and KCLM contributed equally to this work and were mainly responsible for writing the manuscript. NTMM constructed the XL strain. LSC, TFR and GHG performed the ¹⁴C lactate transport assay. BSM performed HPLC analysis. VHC, GSA, EM and KCLM performed the fermentations and their data interpretation. NSP designed and coordinated the study, supervised data interpretation and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Grupo de Engenharia Metabólica Aplicada a Bioprocessos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP 70.790-900, Brazil. ² Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF CEP 70.790-160, Brazil. ³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo CEP 14.040-903, Brazil. ⁴ Integra Bioprocessos e Análises, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Edifício CDT, Sala AT-36/37, Brasília, DF CEP 70.904-970, Brazil.

Acknowledgements

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and material

The patent on which the conclusion of the manuscript relied is deposited publicly under the number BR1020130310522. Information about accession number of the sequence acquired by the BLAST toll (NCBI) is given in the manuscript.

Funding

This work was supported by the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). Grant numbers are 473473/2011-9 and 456452/2012-5. The Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, provided funding for GHG and TFR.

Received: 24 July 2016 Accepted: 8 September 2016

Published online: 15 September 2016

References

- Jang YS, Kim B, Shin JH, Choi YJ, Choi S, Song CW, Lee J, Park HG, Lee SY. Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(10):437–59.
- Chen Y, Nielsen J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;37:165–72.
- Murakami N, Oba M, Iwamoto M, Tashiro Y, Noguchi T, Bonkohara K, Abdel-Rahman MA, Zendo T, Shimoda M, Sakai K, Sonomoto K. L-Lactic acid production from glycerol coupled with acetic acid metabolism by *Enterococcus faecalis* without carbon loss. *J Biosci Bioeng*. 2015;121(1):1–7.
- ANP. Annual Brazilian statistical report on petrol, natural gas and biofuels. 2015.
- Mazumdar S, Blankschien MD, Clomburg JM, Gonzalez R. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2013;12(1):7.
- Mazumdar S, Clomburg JM, Gonzalez R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(13):4327–36.
- Vodnar DC, Dulf FV, Pop OL, Socaciu C. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol. *Microb Cell Fact*. 2013;12(92):1.
- Doi Y. L-lactate production from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Enterococcus faecalis*: cytotoxic evaluation of biodiesel waste and development of a glycerol-inducible gene expression system. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:2082–9.

9. Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. 16 years research on lactic acid production with yeast—ready for the market? *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2010;27:229–56.
10. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv.* 2013;31(6):877–902.
11. Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies—a review. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006;81:1119–29.
12. Zhang YX, Vadlani PV, Kumar A, Hardwidge PR, Govind R, Tanaka T, Kondo A. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:279–88.
13. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D, Kovar K. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnol Adv.* 2014;33(6 Pt 2):1177–93.
14. Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochem Eng J.* 2012;64:91–105.
15. Tang S, Boehme L, Lam H, Zhang Z. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochem Eng J.* 2009;43:157–62.
16. Anastácio GS, Santos KO, Suarez PAZ, Torres FAG, De Marco JL, Parachin NS. Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Bioresour Technol.* 2014;152:505–10.
17. Magalhães BS, Hipolito V, Melo N, Oliveira O, Almeida PBA, Parachin NS. Levedura recombinante para produção de ácido láctico utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. 2013:BR1020130310522.
18. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol.* 2010;4:141.
19. Casal M, Paiva S, Andrade RP, Gancedo C, Leão C. The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J Bacteriol.* 1999;181:2620–3.
20. Soares-Silva I, Schuller D, Andrade RP, Baltazar F, Cassio F, Casal M. Functional expression of the lactate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biochem J.* 2003;376:781–7.
21. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22(4):249–70.
22. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:45–66.
23. Liu XB, Liu M, Tao XY, Zhang ZX, Wang FQ, Wei DZ. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for the production of dammarenediol-II. *J Biotechnol.* 2015;216:47–55.
24. Bhataya A, Schmidt-Dannert C, Lee PC. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochem.* 2009;44:1095–102.
25. Meesapyodsuk D, Chen Y, Ng SH, Chen J, Qiu X. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* to produce ricinoleic acid, a hydroxy fatty acid of industrial importance. *J Lipid Res.* 2015;56:2102–9.
26. Eda Ç, Ozbay N, Oktar N, Çalik P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind Eng Chem Res.* 2008;47:2985–90.
27. Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, Nikawa JI, Shimizu K. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J Ferment Bioeng.* 1998;86:284–9.
28. Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, Nagamori E, Matsuyama T, Kitamoto K, Takahashi H. Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:1964–70.
29. Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, Mattanovich D. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100:177–83.
30. Güneş H, Çalik P. Oxygen transfer as a tool for fine-tuning recombinant protein production by *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016.
31. Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, Aqil T, Zulifqar Z, Tariq A, Muhammad K, Ehsan N, Mehmood S. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *J Radiat Res Appl Sci.* 2014;7:222–9.
32. Barbier GG, Ladd JL, Campbell ER, Campbell WH. Genetic modification of *Pichia Pastoris* for production of propylene glycol from glycerol. *Inter J Genet Eng.* 2011;1:6–13.
33. Leoneti AB, Aragão-Leoneti V, de Oliveira SVWB. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renew Energy.* 2012;45:138–45.
34. da Silva GP, Mack M, Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv.* 2009;27(1):30–9.
35. Yang F, Hanna MA, Sun R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels.* 2012;5:13.
36. Tarmy EM, Kaplan NO. Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem.* 1968;243:2579–86.
37. Maurer M, Kühleitner M, Gasser B, Mattanovich D. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2006;5:37.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

